

(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**

(32) **2006.05.26**

(33) **US**

(43) **2009.04.28**

(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 Дженнифер,
Гроат Джинна, Джонсон Скотт, Келли
Ребекка, Корт Джон, Райс Джеймс
(US)

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

(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

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

US-B2-6868634

US-A1-20040172671

(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 ипсилон (*Agrotis ipsilon*) 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 законом.

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, экспрессирующим 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 дцРНК, которую предоставляют с целью супрессии существенного гена того же вида

насекомого, на который направлен токсин Bt, при этом дцРНК индуцирует реакцию интерференционной РНК при проглатывании целевым вредителем, что предоставляет способы дублирования в случае развития у насекомого устойчивости или к дцРНК, 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*, десенсibilизированные 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 характерах экспрессии, например, различия в относительной экспрессии трансгена в различных тканях растения, которые могут не соответствовать характерам, 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 интрогрессии трансгена в другую генетическую среду с помощью полового ауткроссинга, используя общепринятые способы скрещивания. Потомство от таких скрещиваний сохраняет характеристики экспрессии трансгена исходного трансформанта. Эту 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 дцРНК, экспрессируемые с трансгена(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 aberrантные 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; (b) 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 (b) 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 пищевую 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, экстрагированной из растения кукурузы, образец семян которого депонирован в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером доступа PTA-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 PTA-7455, включающий: (а) приведение в контакт указанного биологического образца с парой молекул ДНК, раскрытой в любом из пп.11-18; (b) 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 PTA-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; (b) 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 PTA-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 PTA-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 PTA-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 PTA-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 PTA-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 PTA-7455; (b) 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 PTA-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 PTA-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 PTA-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 PTA-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 PTA-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 PTA-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 компонентов; причем последовательность стыка охватывает стык между гетерологичной ДНК, вставленной в геном, и ДНК клетки кукурузы, фланкирующей 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' фланкирующей 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-праймеров 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; (b) 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; (b) 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 (b) проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты, образуя тем самым первый ампликон; и (с) обнаружение первого ампликона; и (d) 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 (f) обнаружение второго ампликона; и (g) 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 кукурузу, 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 напитков, 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, нетранслируемая лидерная последовательность САВ пшеницы, интрон актина риса, кодирующая Cry1A.105 последовательность, 3' последовательность терминации и полиаденилирования HSP17 пшеницы, промотор FMV, интрон hsp70, последовательность, кодирующая пептид для переноса в хлоропласт небольшой субъединицы Rubisco, кодирующая Cry2Ab 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, 5th 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 ауткроссинга 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 ауткроссинг 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-мишенью в условиях гибридизации высокой жесткости. Предпочтительно, последовательности зондов и праймеров в соответствии с настоящим изобретением полностью сходны с последовательностью-мишенью, хотя с помощью традиционных способов можно создать зонды, которые отличаются от последовательности-мишени и сохраняют способность гибридизоваться с последовательностями-мишенями.

Способы приготовления и использования зондов и праймеров описаны, например, в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd 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 фланкирующих 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-мишенью. 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 "комплементом" 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 "комплементарны", если они гибридизуются друг с другом с прочностью, достаточной для того, чтобы позволить им оставаться подвергнутыми

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 фланкирующей 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 меченных 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, аденозин-5'-фосфосульфата и люциферина. ddNTP добавляют индивидуально, и включение приводит к световому сигналу, который измеряют. 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 меченных 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 Tyang 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 устранению 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 раскрытые 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) Cry2Ab, 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) Cry1A.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 экспрессирующие 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 фемтомоль 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 MON89034, 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, выбираемую 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 обратной 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 обратной 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 образцом 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 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 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 Cry1A.105 и/или Cry2Ab2 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 PTA-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, выбираемую 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, выбираемую 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 Cry3Bb, или другими сортами трансгенной кукурузы, устойчивой к заражению чешуекрылыми насекомыми в результате вставки последовательностей, кодирующих другие токсичные белки, такие как VIP3a, Cry1Ab и Cry1Fa, и т.п. Различные комбинации всех этих различных трансгенных случаев скрещивают с растениями кукурузы настоящего изобретения, т.е. случаем MON89034, для получения улучшенных сортов гибридной трансгенной кукурузы, устойчивой к заражению жесткокрылыми 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 кукурузы, 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 последовательно-сти, выбираемые из группы, состоящей из:

- (a) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO:5;
- (b) обеих нуклеотидных последовательностей, определенных в SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2;
- (c) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO:3; и
- (d) нуклеотидной последовательности, определенной в SEQ ID NO:4.

Нижеследующие примеры включены для демонстрации примеров некоторых предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения. Квалифицированным в данной области техники специалистам должно быть понятно, что методы, раскрытые в нижеследующих 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 экспрессирующиеся в растениях кассеты, 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 интрона 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 CTP2 или TS-SSU-CTP, 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 нопалинсинтазы *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 экспрессирующей 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 *Cry1A.105*, и второй экспрессионной кассеты, кодирующей *Cry2Ab*, 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 интергации 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 *Cy1A.105* область и ее соответствующие регуляторные элементы, промоторы, интроны и последовательности полиаденилирования 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 *Cry1A.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 (Harbil 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 Taqman 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'-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы Taq 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 *Cry1A.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 Ep-

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 раскрытых 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 Taqman 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	1X 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 6АМ™ 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 термоциклера 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), меченый 6FAM™ праймер PB880 (SEQ ID NO:14) и меченый 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 реакцией 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 их 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 кукурузы 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 образовывать 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, (ресуспендированные 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) (ресуспендированный в свободной от нуклеаз воде до концентрации 10 мкМ)	0,01 мкл	0,4 мкМ конечная концентрация
5	Меченый VIC™ праймер PB2931 (SEQ ID NO: 15) (ресуспендированный 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	2,0 мкл - 4-80 нг геномной ДНК - 4 нг геномной ДНК нетрансгенной кукурузы - без ДНК-матрицы (раствор, в котором ресуспендирована ДНК)	Разведенная в воде
	- Положительный контроль	- 4 нг геномной ДНК из известного случая гетерозиготной кукурузы MON89034	
	- Положительный контроль	- 4 нг геномной ДНК из известного случая гомозиготной кукурузы MON89034	
8	Осторожно смешать, добавить 1-2 капли минерального масла на верх каждой реакции		

Для ведения следующих параметров циклического повторения успешно использовались амплификации ДНК в робоциклере Stratagene, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, или термоциклере Eppendorf Mastercycler Gradient, или системе для ПЦР Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700, или термоциклере 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 термоциклера^a 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

^a - 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 РТА-7455. Депонированный материал будет сохраняться в депозитории в течение периода, составляющего 30 лет, или 5 лет после последнего запроса, или в течение срока действия патента, что больше, 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 РТА-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 РТА-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;

(b) 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;

(b) 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-

курузного 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 PTA-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 PTA-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 PTA-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 PTA-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 PTA-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 PTA-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 PTA-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 PTA-7455.

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

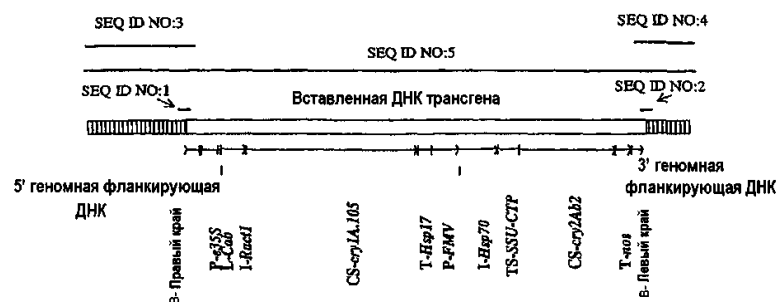
30. Устойчивое к заражению насекомыми паразитами отряда Lepidoptera растение или его потомство, содержащее последовательность SEQ ID NO:5.

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 PTA-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 PTA-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 PTA-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> 11899.0260.00PC00
- <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
actcattgca 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
aatattttaa aatggaagta atactatatt aaaatgattc atgtggaact cctgcgcttc      60
tttttgaagt ttcaaaaggg agctttcagg gtcgcttaga gtttgtttgg ttggaaatac      120
aagcgaagag agagctaatt agggggacat ccataatttc tatggtgttt gaataagagt      180
cacgcgggaa taagatgaac accgaaacaa tttttttgta gctacgtggt tccaaaaaat      240
cgagtagacg gtgtcgcttc cacctcatac tacttcaacc tcaaaccaca catccttacg      300
cgcccgcggg tgtctccgtc gtctcaagtt ctcaacatac ctacacatgt aaccactacc      360
ggtctttgtc atgtttcgaa agaagattac aggtcctcta gaagagagga cgcgggggtg      420
cgagaaagct ggggaagaaa aaggctagta catatgattg gtctgtgaac ctgtgaggtg      480
ggtaggtagg taggtggaga tttttgttaa ctggtgttgt tgacggactc gaacggggcc      540
gggcgtgtgg tgtggctagc tgtggtggtt tgctcgccag ccagccagcc acacatcagc      600
gagcatgcag agcttaagca tgtatgtacg gatcggtctg cttagcgggt aagggtgtgt      660
ttggtttggc ttttggtttt ggcttttgcc ccctaaaagc caaaagccaa ccaagggtgt      720
atttggtttg acttttggtt tttggctttt gtccctaaa agccaaaagc caaacaaggt      780
gttagatcta ggaagcagct ttttctaaaa gctggctttc tcacagtgc aatctgaaag      840
caocctgaa cctgctttta gtggcttttc gaatggaact gtgaaaacat atatcgaaga      900
acttttaacg acttttagtg gtttccacca aacagtttag ctttttaacg gcttacagcc      960
tacaacagct ttttcacag ctcacagccc acagcaactt ttttcacagc cacagcccaa     1020
ccaaacagac ccaaagggc tgaatccagg aagcagcttt ttctaaaagc cgactttctc     1080
gtagtgtaaa actgaaaaca ccctggacc tgcttttagt ggcttttga tggaactgtg     1140
aaaacatata tcgaagaact ttttaacgact ttttagtggt tccaccaaac gattttctagc     1200
tttttaacag cacacagcct acaacagctt ttttcacagc tcacagccca caacaacttt     1260
ttctacagcc acaaccaaac caaacggacc ctaaggcggc cgagcgagcg caaagcgtcg     1320
tcagctttga ttgccatgcc atctcctgct ccacttgtct ctctggccgt cgtcagccac     1380
catccaacaa ggccggtgct actggcggct ctaggttaga cgacgacgac gacgacacct     1440
ccaccgttcg ccgcggtcca ctaccaatc aacacggaac gcccaaaaca cacacacagc     1500
cacgctgggg agggaaaaaa aggcagagac atatgctgct gtcgctgcat tattgtacgc     1560
gatcgaatgg catctctctc actctctctc ctccctttat taatctggta ctggctagct     1620
ggtccggcga caccgacgtg tcagctcctg cgcgcgcgtc cgtcgctccg ctggagcgga     1680

```

```

caaggaccgc ggcgctctgtc gatcgccggc tcgccgcagc gcagctacct agcacgctca 1740
cgcatgctac actgcctaca cgcacacggc cggcccaaaa gcgttccttg ccgcctgccg 1800
gccggctttt ttattattat tggaacatga ggctatttct cctcccacac gggctacgac 1860
gtgagcacga gtactgggat ccccggtacc gccctctctg tccctgctgc tactccagcc 1920
actgaaatgt tgcagatga aacagcagag ccgatctccg cacggaaacc catgcacggc 1980
cattcaaatt caggtgccca cgtacgtcag ggtgctgctg ctactactat caagccaata 2040
aaaggatggt aatgagtatg atggatcagc a 2071

```

```

<210> 4
<211> 914
<212> ДНК
<213> ИСКУССТВЕННАЯ

```

```

<220>
<223> 3' фланкирующая последовательность плюс стык, соответствующие
      SEQ ID NO:5 в положениях 11295-12208

```

```

<400> 4
actcattgca tccccgaaa ttatgttttt ttaaaaacca cggattata gataccgtgt 60
tatTTTTTga gtattgaaa ttctatttca acccaaagtt tcttcattggc acatctagct 120
tttgccaat accatgtagg gctacatctt aaaaatctat actactatat taaagctgca 180
ggggtagcct gtctccacct ggttctgcct cgagccaatc taaaccgtcc atctatatcc 240
atcaaatcag caccgctccg tccgtgcgca cctcctctcc cgtattcag ttgcatactt 300
gcagcaggtt ctccctctct accatttctt ctgcctctct tctcgctcac tggtcagatt 360
cctcctgctt ctcccgcatg cgtcctctcc ccatgccccg tctcgacta tcgccacacc 420
tcaccgcggg gagacgaaga cggtggaagc atctcaact cctccgctag ttgtcgctct 480
tccatctctt tcaacaactt ctacataggg agaggcggtt cggcgctccg acgccgccgc 540
ttctccctct cccatggagg acgagaacat cgacctgggc ggcgggggcg atgcctccgc 600
tctgcataga ggagggttgt agtggaagc agcaatgcc aaccgaggc gggccaagac 660
taggcaacaa taggacggca cggccggttg tcagcgaggt ggcggcacg tgtgccgcta 720
ccgaacaaca tctccggcgc tggagtcggt gagttactgc gccaccgga cgcctcaat 780
gcactgatat ctaccgggtc tccatcgccg cccttctctc ctccctctc cctgtgctc 840
cctctcttgc cctctccctt ccaactgctc cggccccagc cctagcccaa ccacctccg 900
cgcagggtca ccaa 914

```

```

<210> 5

```

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

<220>

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

<400> 5

```

aatatttaaa aatggaagta atactatatt aaaatgattc atgtggaact cctgcgcttc      60
tttttgaagt ttcaaaaggg agctttcagg gtcgcttaga gtttgtttgg ttggaaatac      120
aagcgaagg agagctaag agggggacat ccatattttc tatggtgttt gaataagagt      180
cacgcgggaa taagatgaac accgaaacaa tttttttgta gctacgtggt tccaaaaaat      240
cgagtagacg gtgtcgcttc cacctcatac tacttcaacc tcaaaccaca catccttacg      300
cgcccgccgg tgtctccgtc gtctcaagtt ctcaacatac ctacacatgt aaccactacc      360
ggctctttgtc atgtttcgaa agaagattac aggtcctcta gaagagagga cgcggggtgg      420
cgagaaagct ggggaagaaa aaggctagta catatgattg gtctgtgaac ctgtgaggtg      480
ggtaggtagg taggtggaga tttttgtaa ctggtgttgt tgacggactc gaacggggcc      540
gggcgtgtgg tgtggctagc tgtggtggtt tgctcgccag ccagccagcc acacatcagc      600
gagcatgcag agcttaagca tgtatgtacg gatcggttg cttagcgggt aagggtgtgt      660
ttggtttggc ttttggtttt ggcttttgcc ccctaaaagc caaaagccaa ccaaggtgt      720
atgtgtttg acttttggtt tttggctttt gtccctaaa agccaaaagc caaacaaggt      780
gttagatcta ggaagcagct ttttctaaaa gctggctttc tcacagtga aatctgaaag      840
caccctgaa cctgctttta gtggcttttc gaatggaact gtgaaaacat atatcgaaga      900
acttttaacg acttttagtg gtttccaaca aacagtttag ctttttaacg gcttacagcc      960
tacaacagct ttttcacag ctccacagcc acagcaactt ttttcacagc cacagcccaa     1020
ccaaacagac cccaaagggc tgaatccagg aagcagcttt ttctaaaagc cgactttctc     1080
gtagtgtaaa actgaaaaca cccctggacc tgcttttagt ggcttttggg ttggaactgtg     1140
aaaacatata tcgaagaact tttaacgact tttagtgggt tcaccaaac gattttctagc     1200
tttttaacag cacacagcct acaacagctt ttttcacagc tcacagccca caacaacttt     1260
ttctacagcc acaaccaaac caaacggacc ctaaggcggc cgagcgagcg caaagcgtcg     1320
tcagctttga ttgccatgcc atctcctgct ccacttgtct ctctggccgt cgtcagccac     1380
catccaacaa ggccggtgct actggcggct cctaggtaga cgacgacgac gacgacacct     1440
ccaccgttcg ccgcggtcca ctccaatc aacacggaac gcccaaaaca cacacacacg     1500

```

cacgctgggg agggaaaaaa aggcagagac atatgcgtgc gtcgctgcat tattgtacgc 1560
 gatogaatgg catctctctc actctctctc ctccctttat taatctggta ctggctagct 1620
 ggtccggcga caccgacgtg tcagctccgt cgcgcgcgtc cgtccgtccg ctggagcgga 1680
 caccggaccgc ggcgctctgtc gatcgccggc tcgcccgcagc gcagctacct agcacgctca 1740
 cgcattgctac actgcctaca cgcacacggc cggcccaaaa gcgttccttg ccgcctgccg 1800
 gcgggctttt ttattattat tggaaatga ggctatttct cctcccacac gggctacgac 1860
 gtgagcacga gtactgggat ccccgatcc gccctctctg tccctgctgc tactccagcc 1920
 actgaaatgt tgtcagatga aacagcagag ccgatctccg caccgaaacc catgcacggc 1980
 cattcaaatt cagggtgccc cgtacgtcag ggtgctgctg ctactactat caagccaata 2040
 aaaggatggg aatgagtatg atggatcagc aatgagtatg atggtaata tggagaaaaa 2100
 gaaagagtaa ttaccaattt tttttcaatt caaaaatgta gatgtccgca gcgttattat 2160
 aaaatgaaag tacattttga taaaacgaca aattacgac cgtcgtattt ataggcgaaa 2220
 gcaataaaca aattattcta attcggaaat ctttatttct acgtgtctac attcacgtcc 2280
 aaatgggggc ttagatgaga aacttcacga tttggcgcgc caaagcttgg tcgagtggaa 2340
 gctagctttc cgatcctacc tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaaggtagct 2400
 cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca 2460
 gtggtcccaa agatggacce ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa 2520
 ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac 2580
 aatccacta tccttcgcaa gacccttcct ctatataagg aagttcattt catttgagaa 2640
 ggacacgctg acaagctgac tctagcagat cctctagaac catcttccac aactcaagc 2700
 cacactattg gagaacacac agggacaaca caccataaga tccaaggag gcctccgccg 2760
 ccgcccgtta ccccccgc cctctctctt ttctttctcc gttttttttt ccgtctcggt 2820
 ctogatcttt ggcttggta gtttgggtgg gcgagaggcg gcttcgtgcg cgcacagatc 2880
 ggtgcgcggg aggggcggga tctgcggct ggggctctcg ccggcgtgga tccggcccgg 2940
 atctgcggg gaatggggct ctccgatgta gatctgcgat ccgccgttgt tgggggagat 3000
 gatggggggg ttaaaatttc gcgcgtgcta aacaagatca ggaagagggg aaaagggcac 3060
 tatggtttat atttttatat atttctgctg ctctgcagc cttagatgtg ctagatcttt 3120
 ctttctctct tttgtggta gaatttgaat ccttcagcat tgttcacggt tagtttttct 3180
 tttcatgatt tgtgacaaa gcagcctcgt gcggagcttt tttgtaggta gaagtgatca 3240
 accatggaca acaacccaaa catcaacgag tgcacccgt acaactgcct cagcaaccct 3300

gaggtcgagg tgctcggcgg tgagcgcac gagaccgggt acacccccat cgacatctcc 3360
 ctctccctca cgcagttcct gctcagcgag ttctgtgccag gcgctggctt cgtcctgggc 3420
 ctctgtggaca tcatctgggg catctttggc ccctcccagt gggacgcctt cctggtgcaa 3480
 atcgagcagc tcatcaacca gaggatcgag gagttogcca ggaaccaggc catcagccgc 3540
 ctggaggggc tcagcaacct ctaccaaac tacgtcgaga gcttcgcga gtgggaggcc 3600
 gaccccacta acccagctct ccgcgaggag atgcgcaccc agttcaacga catgaacagc 3660
 gccctgacca ccgccatccc actcttcgcc gtccagaact accaagtccc gctcctgtcc 3720
 gtgtacgtcc aggccgcaa cctgcacctc agcgtgctga gggacgtcag cgtgtttggc 3780
 cagaggtggg gcttcgacgc cggcaccatc aacagccgct acaacgacct caccaggctg 3840
 atcggaact acaccgacca cgtgtccgc tggtaacaac ctggccgtcc tggacattgt 3900
 gtccctcttc ccgaactacg actcccgac ctaccggatc cgcaccgtgt cccaactgac 3960
 ccgcgaaatc tacaccaacc ccgtcctgga gaacttcgac ggtagcttca ggggcagcgc 4020
 ccagggcacg gagggtcca tcaggagccc acacctgatg gacatcctca acagcatcac 4080
 tatctacacc gatgccacc gcggcgagta ctactggtcc ggccaccaga tcatggcctc 4140
 ccgggtcggc ttcagcggcc ccgagtttac ctttctctc tacggcaaga tgggcaacgc 4200
 cgctccaaa caacgcacg tcgctcagct gggccagggc gtctaccga ccctgagctc 4260
 caccctgtac cgcaggccct tcaacatcgg tatcaacaac cagcagctgt ccgtcctgga 4320
 tggcactgag ttgcctacg gcacctctc caacctgcc tccgtgtct accgcaagag 4380
 cggcacggtg gattccctgg acgagatccc accacagaac aacaatgtgc ccccaggca 4440
 gggtttttcc cacaggctca gccacgtgtc catgttcgc tccggcttca gcaactcgtc 4500
 cgtgagcatc atcagagctc ctatgttctc ttggatacac cgtagtgtg agttcaacaa 4560
 catcattgca tccgacagca ttactcaaat acccttggtg aaagcacata cacttcagtc 4620
 aggtactact gttgtcagag gtccagggtt tacaggagga gacattcttc gtgcacaag 4680
 tggaggaccc tttgcttaca ctattgttaa catcaatggc caattgcccc aaaggtatcg 4740
 tgcaagaatc cgtatgcct ctactacaaa tctcaggatc tacgtgactg ttgcagggtga 4800
 aaggatcttt gctggtcagt tcaacaagac tatggatacc ggtgacctt tgacattcca 4860
 atcttttagc tacgcaacta tcaacacagc ttttacattc ccaatgagcc agagtagctt 4920
 cacagtaggt gctgacactt tcagctcagg gaatgaagtt tacatcgaca ggtttgaatt 4980
 gattccagtt actgcaaccc tcgaggtga gtacaacctt gagagagccc agaaggctgt 5040
 gaacgcctc tttacctca ccaatcagct tggcttgaac actaacgtta ctgactatca 5100

cattgaccaa gtgtccaact tggtcaccta ccttagcgat gagttctgcc tcgacgagaa 5160
gogtgaactc tccgagaaag ttaaacacgc caagcgtctc agcgacgaga ggaatctctt 5220
gcaagactcc aacttcaaag acatcaacag gcagccagaa cgtgggtggg gtggaagcac 5280
cgggatcacc atccaaggag gcgacgatgt gttcaaggag aactacgtca cctctccgg 5340
aactttcgac gagtgctacc ctacctactt gtaccagaag atcgatgagt ccaaactcaa 5400
agccttcacc aggtatcaac ttagaggcta catcgaagac agccaagacc ttgaaatcta 5460
ctcgatcagg tacaatgcca agcacgagac cgtgaatgtc ccaggtaactg gttccctctg 5520
gccactttct gcccaatctc ccattgggaa gtgtggagag cctaacagat gcgctccaca 5580
ccttgagtgg aatcctgact tggactgtct ctgcagggat ggcgagaagt gtgcccacca 5640
ttctcatcac ttctccttgg acatcgatgt gggatgtact gacctgaatg aggacctcgg 5700
agtctgggtc atcttcaaga tcaagaccca agacggacac gcaagacttg gcaaccttga 5760
gtttctcgaa gagaaaccat tggtcggtga agctctcgtc cgtgtgaaga gagcagagaa 5820
gaagtggagg gacaaacgtg agaaactcga atgggaaact aacatcgttt acaaggaggc 5880
caaagagtcc gtggatgctt tgttcgtgaa ctccaatat gatcagttgc aagccgacac 5940
caacatcgcc atgatccacg ccgagacaa acgtgtgcac agcattcgtg aggcttactt 6000
gcctgagttg tccgtgatcc ctggtgtgaa cgctgccatc ttcgaggaac ttgagggacg 6060
tatctttacc gcattctcct tgtacgatgc cagaaacgtc atcaagaaag gtgacttcaa 6120
caatggcctc agctgctgga atgtgaaagg tcatgtggac gtggaggaa acagaacaatca 6180
gcgttcgctc ctggttgtgc ctgagtggga agctgaagtg tcccaagagg ttagagtctg 6240
tccaggtaga ggctacattc tccgtgtgac cgcttacaag gagggatacg gtgaggggtg 6300
cgtgaccatc cagagatcg agaacaacac cgacgagctt aagttctcca actgcgtcga 6360
ggaagaaaac tatcccaaca acaccgttac ttgcaacgac tacactgtga atcaggaaga 6420
gtacggaggt gcctacacta gccgtaacag aggttacaac gaagctcctt ccgttcctgc 6480
tgactatgcc tccgtgtacg aggagaaac ctacacagat ggcagacgtg agaacccttg 6540
cgagttcaac agaggttaca gggactacac accacttcca gttggctatg ttaccaagga 6600
gcttgagtae ttctctgaga ccgacaaagt gtggatcgag atcggtgaaa ccgagggaa 6660
cttcatcgtg gacagcgtgg agcttctctt gatggaggaa taatgagatc tatcgattct 6720
agaaggcctg aattctgcat gcgtttggac gtatgctcat tcagggttga gccaatattg 6780
ttgatgtgtg tgcgagttct tgcgagctct atgagacatc tctgtattgt gtttctttcc 6840
ccagtgtttt ctgtacttgt gtaatcggct aatcgccaac agattcggcg atgaataaat 6900

gagaaataaa ttgttctgat tttgagtgc aaaaaaagg aattagatct gtgtgtgttt	6960
tttggatccc cggggcgggc gcgttaacaa gcttgagctc aggatttagc agcattccag	7020
attgggttca atcaacaagg tacgagccat atcactttat tcaaattggt atcgccaaaa	7080
ccaagaagga actcccatcc tcaaagggtt gtaaggaaga attctcagtc caaagcctca	7140
acaaggtcag ggtacagagt ctccaaacca ttagccaaaa gctacaggag atcaatgaag	7200
aatcttcaat caaagtaaac tactgttcca gcacatgcat catggtcagt aagtttcaga	7260
aaaagacatc caccgaagac ttaaagttag tgggcattct tgaaagtaat cttgtcaaca	7320
tcgagcagct ggcttgtggg gaccagacaa aaaaggaatg gtgcagaatt gttaggcgca	7380
cctacccaaa gcattcttgc ctttattgca aagataaagc agattcctct agtacaagtg	7440
gggaacaaaa taacgtggaa aagagctgtc ctgacagccc actcactaat gcgtatgacg	7500
aacgcagtga cgaccacaaa agaattccct ctatataaga aggcattcat tcccatttga	7560
aggatcatca gatactcaac caatccttct aggatctacc gtcttcggta cgcgtcact	7620
ccgcccctctg ccttgtttac tgccacgttt ctctgaatgc tctcttgtgt ggtgattgct	7680
gagagtgggt tagctggatc tagaattaca ctctgaaatc gtgttctgcc tgtgctgatt	7740
acttgccgtc ctttgttagc gcaaaatata gggacatggt agtacgaaac gaagatagaa	7800
cctacacagc aatacgagaa atgtgtaatt tgggtgcttag cggtatattat ttaagcacat	7860
gttggtgtta tagggcactt ggattcagaa gtttgctgtt aatttaggca caggcttcat	7920
actacatggg tcaatagtat agggattcat attataggcg atactataat aatttgttcg	7980
tctgcagagc ttattatttg ccaaaattag atattcctat tctgtttttg tttgtgtgct	8040
gttaaattgt taacgcctga aggaataaat ataaatgacg aaattttgat gtttatctct	8100
gtccttttat tgtgaccata agtcaagatc agatgcactt gttttaataa ttgttgtctg	8160
aagaaataag tactgacagt attttgatgc attgatctgc ttgtttgttg taacaaaatt	8220
taaaaataaa gagtttcctt tttgttgctc tcttacctc ctgatgggat ctagtatcta	8280
ccaactgaca ctatattgct tctctttaca tacgtatctt gctcgatgcc ttctccctag	8340
tgttgaccag tgttactcac atagtctttg ctcatctcat tgtaatgcag ataccaagcg	8400
gcctctagag gatcagcatg gcgcccaccg tgatgatggc ctcgtcggcc accgcgctcg	8460
ctccgttcca ggggtcctaag tccaccgcca gcctccccgt cgcgcgcgcg tccctcagaa	8520
gcctcggcaa cgtcagcaac ggcggaagga tccggtgcat gcaggtaaca aatgcattct	8580
agctagtagt tctttgcatt gcagcagctg cagctagcga gttagtaata ggaagggaac	8640
tgatgatcca tgcattggaat gatgtgtgtt gcccatccca tccattttcc caaccccaaa	8700

cgaacccaaaa cacacgtact acgtgcaggt gtggccggcc tacggcaaca agaagttcga 8760
 gacgctgtcg tacctgccgc cgctgtcgac cggcggggcg atccgctgca tgcaggccat 8820
 ggacaactcc gtcctgaact ctggtcgcac caccatctgc gacgcctaca acgtcgcggc 8880
 gcatgatcca ttcagcttcc agcacaagag cctcgacact gttcagaagg agtggacgga 8940
 gtggaagaag aacaaccaca gcctgtacct ggaccccatc gtcggcacgg tggccagott 9000
 ccttctcaag aaggtcggct ctctcgtcgg gaagcgcac ctctcggaac tccgcaacct 9060
 gatctttcca tctggctcca ccaacctcat gcaagacatc ctcagggaga ccgagaagtt 9120
 tctcaaccag cgcctcaaca ctgataacct tgctcgcgtc aacgctgagc tgacgggtct 9180
 gcaagcaaac gtggaggagt tcaaccgcca agtggacaac ttctcaacc ccaaccgcaa 9240
 tgcgggtgct ctgtccatca cttcttcctg gaacaccatg caacaactgt tctcaaccg 9300
 cttgctcag ttccagatgc aaggctacca gctgctctg ctgccactct ttgctcagga 9360
 tgccaacctg cacctctct tcatctgtga cgtgatctc aacgctgacg agtggggcat 9420
 ctctgcagcc acgctgagga cctaccgga ctacctgaag aactacacca gggactactc 9480
 caactattgc atcaaacct accagtcggc cttcaagggc ctcaatacga ggcttcacga 9540
 catgctggag ttcaggacct acatgttct gaacgtgttc gactacgtca gcatctggtc 9600
 gctcttcaag taccagagcc tgctgggtgc cagcggcgcc aacctctacg ccagcggctc 9660
 tggcccccaa caaactcaga gcttcaccag ccaggactgg ccattcctgt attcgttgtt 9720
 ccaagtcaac tccaactacg tctcaaccg cttctctggt gctgcctct ccaacacctt 9780
 cccaacatt gttggcctcc ccggctccac cacaactcat gctctgctt ctgccagagt 9840
 gaactactcc ggcggcatct cgagcggcga catttggtga tcgccgttca accagaactt 9900
 caactgctcc accttctgc cgcgctgct caccctgtc gtgaggtcct ggctcgacag 9960
 cggctccgac cgcgagggcg tggccaccgt caccaactgg caaaccgagt ccttcgagac 10020
 cacccttggc ctccggagcg gcgccttcac ggcgctgga aattetaact acttccccga 10080
 ctacttcac aggaacatct ctgggtgttc tctcgtcgtc cgcaacgagg acctccgccg 10140
 tccactgcac tacaacgaga tcaggaacat cgcctctccg tccgggacgc ccggaggtgc 10200
 aagggcgtac atggtgagcg tccataacag gaagaacaac atccacgctg tgcagagaa 10260
 cggctccatg atccacctgg cgcctaatga ttacaccggc ttcacctct ctccaatcca 10320
 cgccacccaa gtgaacaacc agacacgcac ctcatctcc gagaagttcg gcaaccaggg 10380
 cgactcctg aggttcgagc agaacaacac caccgccagg tacacctgc gcggcaacgg 10440
 caacagctac aacctgtacc tgcgcgtcag ctccattggc aactccacca tcagggtcac 10500

catcaacggg aggggtgtaca cagccaccaa tgtgaacacg acgaccaaca atgatggcgt 10560
caacgacaac ggcgcccgt tcagcgacat caacattggc aacgtgggtg ccagcagcaa 10620
ctccgacgtc ccgctggaca tcaacgtgac cctgaactct ggcacccagt tcgacctcat 10680
gaacatcatg ctggtgccaa ctaacatctc gcgctgtac tgataggagc tctgatcccc 10740
atgggaattc ccgatcgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt 10800
gccggtcttg cgatgattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt 10860
aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta 10920
tacatttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc 10980
gcggtgtcat ctatgttact agatcgggga tatccccggg gcggccgggg ggaattcggg 11040
accaagcttt ggcgcgccaa atcgtgaagt ttctcatcta agccccatt tggacgtgaa 11100
tgtagacacg tcgaaataaa gatttcogaa ttagaataat ttgtttattg ctttcgccta 11160
taaatacgac ggatcgtaat ttgtcgtttt atcaaatgt actttcattt tataataacg 11220
ctgcggacat ctacattttt gaattgaaaa aaaattggta attactcttt cttttctctc 11280
atattgacca tcatactcat tgcacccccg gaaattatgt ttttttaaaa accacgggat 11340
tatagatacc gtgttatttt ttgagtattg gaaatttcat ttcaacccaa agtttcttca 11400
tggcacatct agcttttggc taataccatg tagggctaca tcttaaaaat ctatactact 11460
atattaaagc tgcaggggta gcctgtctcc acctggttct gcctcgagcc aatctaaacc 11520
gtccatctat atccatcaaa tcagcacctg ccggctcgtg cgcacctcct ctcccgctat 11580
tcagttgcat acttgacgca ggttctccct cctcaccatt tctctgcct cctctctcgc 11640
tcaactggta gattcatcct gcctctcccg catgcctcc ctccccatgc cccgtctcgc 11700
actatcgcca cacctcaccg cggggagacg aagacggtg acgcacctc acctcctccg 11760
ctagttgtcg ctcttccatc ctcttcaaca acttctacat agggagaggg ggttcggcgt 11820
cccgacgcg ccgcttctcc cctccccatg gaggacgaga acatcgacct cggcggcggg 11880
ggcgatgcct ccgctctgca tagaggaggg ttgtagtggc aagcagcaat gccaacaccg 11940
aggcgggcca agactaggca acaataggac ggcacgccc gttgtcagcg aggtggcggc 12000
atcgtgtgcc gctaccgaac aacatctcgc gcgctggagt cggtgagtta ctgcgccacc 12060
cggacgcct caatgcactg atatctaccc ggtctccatc gccgcccttc ctcccttccc 12120
tctccctgtg cctccctctc ttgcctctc ccttccaaact gctcccgccc cagccctagc 12180
ccaaccacct 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

ggatccctc cagaccagca 20

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

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<400> 9

gtggactcct tctggatggt gtaa 24

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

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<400> 10

gtcaggggtgc tgctgctgct a 21

<210> 11

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<400> 11

gggtttaagaa 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

atratttysg 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 aataaaaggg ttgttt

26

<210> 16
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Искусственная

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<400> 16
 ctgtcaagcc aataaaaggg 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; обратнoкомплементарная последовательности, соответствующей SEQ ID NO:5 в положениях 4605-4628

<400> 18
 aactcagcac tacggtgtat ccaa

24

<210> 19
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
 <400> 19
 ggcctgccgca 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
 tccagtacgt gcagtccttc ctcctc 26

