



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112758** (13) **C2**
(51) МПК (2016.01)**C12N 15/82** (2006.01)**C12N 15/87** (2006.01)**B82B 3/00****B82Y 5/00****B82Y 15/00****B82Y 40/00**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2013 01427	(72) Винахідник(и): Йо Керрм Й. (US), Семьюел Джаякумар Пон (US), Берроуз Френк Дж. (US), Самбоджу Нарасімха Чарі (US), Уебб Стівен Р. (US)
(22) Дата подання заявки: 07.07.2011	(73) Власник(и): ДАУ АГРОСАЙЕНСІЗ ЕЛЕЛСІ, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.10.2016	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/362,222	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Frank Muller et al., "Quantum dots - a versatile tool in plant science?", Journal of Nanobiotechnology, 15.06.2006, vol. 4, no. 5, pages 1 - 5 US 20050123974 A1, 09.06.2005 US 20040181821 A1, 16.09.2004 US 20060223125 A1, 05.10.2006 US 20060088903 A1, 27.04.2006 WO 2009046384 A1, 09.04.2009 WO 9932642 A2, 01.07.1999 Yao Q et al, "Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment", Journal of Experimental Botany, Oxford University Press, GB, 01.11.2006, vol. 57, no. 14, pages 3737 - 3746
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 07.07.2010	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 13.05.2013, Бюл.№ 9	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.10.2016, Бюл.№ 20	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2011/043217, 07.07.2011	

(54) СПОСІБ ВВЕДЕННЯ МОЛЕКУЛИ ФУНКЦІОНАЛІЗОВАНОЇ ЛІНІЙНОЇ НУКЛЕОТИДНОЇ КАСЕТИ У КЛІТИНУ, ЩО МІСТИТЬ КЛІТИННУ СТІНКУ**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу введення молекули функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, у клітину рослини, що має клітинну стінку, причому спосіб включає в себе надання рослинної клітини, що має клітинну стінку, покриття наночастинки на основі квантової точки молекулою функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, здійснення контакту між рослинною клітиною, що має клітинну стінку, і покритою наночастинкою на основі квантової точки; і забезпечення можливості поглинання

UA 112758 C2

наночастинки на основі квантової точки і молекули функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, рослинною клітиною, що містить клітинну стінку. Наночастинка на основі квантової точки містить функціональну групу, яка взаємодіє з молекулою функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети.

ЗАЯВКА НА ПРІОРИТЕТ

Дана заявка заявляє пріоритет дати подачі попередньої патентної заявки США із серійним номером 61/362,222, поданої 7 липня 2010 р. за назвою "ОДЕРЖАННЯ ФУНКЦІОНАЛІЗОВАНОЇ ДНК-КАСЕТИ Й ОПОСЕРЕДКОВАНА КВАНТОВИМИ ТОЧКАМИ/НАНОЧАСТИНКАМИ ДОСТАВКА В РОСЛИНИ".

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Даний винахід стосується способів використання наночастинок для неінвазивної доставки молекул функціоналізованих лінійних нуклеотидних касет у рослинні клітини, що мають інтактну клітинну стінку.

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

Наночастинки мають унікальні властивості, які використовуються для доставки ДНК у визначені тваринні клітини. Було знайдено, що при інкубації деяких наночастинок, покритих ДНК, із клітинами, що не мають клітинної стінки, клітини поглинали наночастинки і починали експресувати гени, кодовані ДНК. Напівпровідникові наночастинки (наприклад, квантові точки ("QD")) з розміром частинок у діапазоні 3-5 нм також використовувалися як носії для доставки молекул у клітини. ДНК і білки можна приєднати до деяких лігандів, прикріплених до поверхні QD. Див., наприклад, Patolsky et al. (2003), J. Am. Chem. Soc. 125:13918. Покриті карбоновими кислотами або амінами QD можуть бути зшиті з молекулами, що містять тіольну групу, див., наприклад, Dubertret et al. (2002), Science, 298:1759; Akerman et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:12617; Mitchell et al. (1999), J. Am. Chem. Soc. 121:8122, або N-гідроксисукцинімілну ("NHS") складноєфірну групу, з використанням стандартних протоколів біокон'югації. Див., наприклад, Pinaud et al. (2004), J. Am. Chem. Soc. 126:6115; Bruchez et al. (1998), Science, 281:2013. Альтернативним шляхом приєднання молекул до поверхні QD є кон'югація покритих стрептавідином QD з біотинільованими білками, олігонуклеотидами або антитілами. Див., наприклад, Dahan et al. (2003), Science, 302:442; Pinaud et al. (2004), J. Am. Chem. Soc. 126:6115; Wu et al. (2003), Nature Biotechnol. 21:41; Jaiswal et al. (2003), Nature Biotechnol. 21:47; i Mansson et al. (2004), Biochem. Biophys. Res. Commun. 314:529.

Доставка молекул чужорідних нуклеїнових кислот у рослини ускладнюється наявністю стінки у клітин рослин. В основі існуючих способів для генетичної трансформації рослин лежить інвазивна доставка. В клітинах рослин клітинна стінка являє собою бар'єр, який перешкоджає доставці екзогенно внесених молекул. Для доставки в покриті стінкою клітини рослин генів і низькомолекулярних сполук використовується множина інвазивних способів клітинної доставки, наприклад біолістична доставка (генна гармата), мікроін'єкція, електропорація й опосередкована агробактеріями трансформація, але доставку білків можна здійснити тільки за допомогою мікроін'єкції. Якщо необхідна доставка молекул нуклеїнових кислот за допомогою наночастинок, то клітинну стінку видаляють перед додаванням частинок до протопластів рослини. Див., наприклад, Tomey et al. (2007), Nature Nanotechnol. 2:295-300.

Більше того, загальноприйняті методики трансформації рослин, такі як опосередкована агробактеріями трансформація, вимагають використання рекомбінантної плазмід. Ці загальноприйняті методики, тому, приводять до небажаного вбудовування каркасної послідовності бактеріального вектора в геном хазяїна разом з приєднаними до нього екзогенними генами. Див., наприклад, Kohli et al. (1999), Plant J. 17:591-601; i Meza et al. (2002), Nucleic Acids Res. 30(20):4556-66. Присутність векторної базової послідовності в трансплантаті непотрібна в процедурах біолістичного перенесення. Крім того, векторні базові послідовності мають тенденцію стимулювати небажану рекомбінацію, забезпечуючи АТ-багаті послідовності як "гарячі точки" рекомбінації в процесі утворення вторинних структур. Muller et al. (1999), J. Mol. Biol. 291:29-46. Векторні каркасні послідовності можуть додатково забезпечувати нові послідовності "філерної" ДНК (вставок ДНК), гомологічної фланкуючій геномній ДНК рослин, що можуть виділятися в навколишнє середовище. Kohli et al. (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:7203-8; Pawlowski and Somers (2000), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:12106-10; Svitashv et al. (2002), Plant J. 32:433-45.

Трансформація трансгенними касетами з використанням бомбардування частинками мала обмежений успіх на культурі тканин і на рослинах рису (*Oryza sativa*) і картоплі (*Solanum tuberosum*). Fu et al. (2000), Transgenic Res. 9:11-9; Loc et al. (2002), Mol. Breeding, 9:231-44; Romano et al. (2003), Transgenic Res. 12:461-73; i Agrawal et al. (2005), Mol. Breeding 16:247-60. Передбачається, що ці біолістичні методики генерують більший відсоток трансгенних рослин рису і картоплі з простими схемами вбудовування. Дві групи лінійних генетичних конструкцій (gus і bar, і 1Ax1 і bar), у яких відсутні базові векторні послідовності, незалежно переносили в елітний сорт ЕМ12 пшениці (*Triticum aestivum* L.) бомбардуванням частинками і виділяли генетично стабільні рослини з низькокопійним вбудованим трансгеном. Yao et al. (2006), J. Exp.

Botany, 57(14):3737-46. Спостережувана ефективність трансформації при біолістичному бомбардуванні складала від 0,2 до 0,6. Ід. Передбачається, що три потенційних елементи (а саме зниження ступеня конкатемеризації перед вбудовуванням трансгена; обмеження можливості перестановок у трансгені і попередження гомологічних взаємодій між різними

трансгенами протягом подій вбудовування) діють спільно, забезпечуючи прості інтактні трансгенні локуси, представлені простими картинами гібридизації. Agrawal et al. (2005), вище.

На сьогоднішній момент бомбардування частинками і Whiskers™ (див. патенти США №№ 5,464,765 і 5,302,523) разом з розщепленими ферментами рестрикції фрагментами ДНК є

єдиним шляхом доставки лінійних ДНК-касет у клітини рослин, що мають інтактні клітинні стінки.

ОПИС ВИНАХОДУ

У даному винаході описані способи і композиції для використання наночастинок і лінеаризованих молекул нуклеїнових кислот для введення молекули, що представляє інтерес, у рослинну клітину, яка має клітинну стінку. Деякі варіанти здійснення способів за винаходом можна використовувати для одержання стабільно трансформованої генетично-модифікованої фертильної рослини. У деяких варіантах здійснення винаходу відмітні властивості молекул функціоналізованих лінійних нуклеотидних касет дозволяють доставку послідовностей визначених генів, що представляють інтерес, без небажаних нуклеотидних послідовностей, наприклад, без обмеження, векторних базових послідовностей.

У варіантах здійснення винаходу для трансформації рослинних клітин, що мають клітинну стінку, можна використовувати декілька різних типів наночастинок. У деяких варіантах здійснення винаходу наночастинки можуть бути ПЕГильовані (мати приєднані молекули ПЕГ) з молекулами функціоналізованих лінійних нуклеотидних касет. У конкретних варіантах здійснення винаходу наночастинами можуть бути напівпровідникові наночастинки, такі як квантові точки ("QD"), або частинки золота. В інших варіантах здійснення винаходу молекулами функціоналізованих лінійних нуклеотидних касет може бути лінеаризована плазмідна ДНК. В альтернативних варіантах здійснення винаходу молекули функціоналізованих лінійних нуклеотидних касет можуть містити послідовності, що кодують фосфінотрицин-N-ацетилтрансферазу (PAT) і/або жовтий флуоресцентний білок (YFP).

Також винахід стосується способів введення цільової молекули в рослинну клітину, що має клітинну стінку, причому способи можуть включати надання рослинної клітини, що має клітинну стінку; покривання поверхні наночастинок щонайменше однією молекулою функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес; здійснення контакту між рослинною клітиною, що має клітинну стінку, і наночастинами, покритими молекулою(ами) функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес; і забезпечення можливості поглинання наночастинок і молекул(и) функціоналізованих лінійних нуклеотидних касет, що представляють інтерес, рослинною клітиною, що містить клітинну стінку. У конкретних варіантах здійснення винаходу молекулою, що представляє інтерес, функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети може бути біотинільована молекула лінеаризованої дволанцюжкової ДНК, яка містить ген, що представляє інтерес. У додаткових варіантах здійснення винаходу молекулою, що представляє інтерес, функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети може бути хімічно немодифікована молекула дволанцюжкової ДНК, яка містить ген, що представляє інтерес. У конкретних варіантах здійснення винаходу наночастиною може бути QD-стрептавідинова наночастинка. Функціоналізовані молекули лінійних нуклеотидних касет можна кон'югувати з наночастинами з використанням різноманітних реагентів з різними функціональними групами. У деяких варіантах здійснення винаходу поверхня наночастинок може бути функціоналізована білками і/або іншими молекулами, наприклад пестицидами, які несуть сумісні функціональні групи. У деяких варіантах здійснення винаходу поверхня наночастинок може бути кон'югована більше ніж з одним типом молекул. Тому, у конкретних варіантах здійснення винаходу поверхня наночастинок може бути спільно функціоналізована проникаючими в клітину пестицидами і молекулами лінеаризованих нуклеотидних касет, наприклад, для полегшення спрямованої доставки біомолекул.

Додатково розкриті способи інтрогресії ознаки в рослину. У деяких варіантах здійснення винаходу спосіб може включати надання рослинної клітини; покривання поверхні наночастинок засобом для експресії ознаки в рослині; здійснення контакту між рослинною клітиною і наночастинами, покритими засобом для експресії ознаки в рослині; забезпечення можливості поглинання наночастинок і засобу для експресії ознаки в рослині рослинною клітиною для одержання трансформованої рослинної клітини; регенерацію цілої рослини з трансформованої рослинної клітини і розмноження рослини. У деяких варіантах здійснення винаходу ознака, яку можна інтрогресувати відповідно до способів за винаходом, включає в себе ознаку, вибрану,

без обмеження, з: чоловічої стерильності, стійкості до гербіциду, стійкості до комах і стійкості до бактеріального захворювання, грибкового захворювання і/або вірусного захворювання.

Також розкриті способи за винаходом, які можна використовувати для *in planta* трансформації рослин. У деяких варіантах здійснення винаходу рослина може бути вибрана з рослин роду *Arabidopsis*, наприклад *A. thaliana*. У конкретних варіантах здійснення винаходу рослина, трансформована за допомогою *in planta* трансформації, може бути вибрана з рослин *A. thaliana* екотипу *Columbia*.

Додатково розкриті генетично модифіковані рослинні клітини (ГМ) і способи їх одержання, причому рослинні клітини мають одну або декілька нуклеїнових кислот, введених у них способами за даним винаходом. У деяких варіантах здійснення винаходу плазміда, яка містить щонайменше один ген, що представляє інтерес, і селектований маркер, може бути введена в клітину рослини, що має клітинну стінку, за допомогою наночастинок згідно з даним винаходом. У додаткових варіантах здійснення винаходу можна відібрати стабільні трансформанти, які мають стабільно вбудований щонайменше один ген, що представляє інтерес, і/або селектований маркер. В альтернативних варіантах здійснення винаходу рослинну клітину, яка вже містить щонайменше один ген, що представляє інтерес, можна розмножувати для одержання інших клітин, які містять молекулу, що представляє інтерес. В інших варіантах здійснення винаходу рослинною клітиною, яка містить молекулу, що представляє інтерес, може бути здатна до регенерації клітина, яку можна використовувати для регенерації цілої рослини, яка включає молекулу, що представляє інтерес.

Додатково розкриті способи створення регенованих рослинних клітин, які включають у себе молекулу, що представляє інтерес, для використання в культурі тканин. Культура тканин може мати здатність до регенерації рослин, що мають по суті однаковий генотип з регенованими клітинами. Регенованими клітинами в таких культурах тканин можуть бути, наприклад, зародки, протопласти, меристемні клітини, калюс, пиліок, листи, пиляки, корені, кінчики коренів, квітки, насіння, стручки або стебла. Додатково, деякі варіанти здійснення винаходу стосуються рослин, регенованих з культур тканин за винаходом.

Додатково розкриті способи одержання стабілізованих ліній рослин, які включають у себе бажану ознаку або молекулу нуклеїнової кислоти, що представляє інтерес, причому бажана ознака або молекула нуклеїнової кислоти, що представляє інтерес, може бути початково введена шляхом поглинання наночастинок через рослинну клітинну стінку. Способи одержання стабілізованих ліній рослин добре відомі середньому фахівцю в даній галузі і можуть включати методики, такі як, але не обмежуючись ними: самозапилення; поворотне схрещування; одержання гібридів; схрещування з популяціями і т. п. Тому у винаході розкриті рослини і рослинні клітини, які включають у себе бажану ознаку або молекулу нуклеїнової кислоти, що представляє інтерес, початково введену в рослинну клітину (або її попередників) шляхом введення наночастинок через клітинну стінку. Рослинну клітину, яка включає в себе бажану ознаку або молекулу нуклеїнової кислоти, що представляє інтерес, початково введену в рослинну клітину (або її попередників) шляхом введення наночастинок через клітинну стінку, можна використовувати в схрещуванні з іншими рослинними клітинами, що відрізняються від неї, щоб одержати гібридні клітини, насіння і/або рослини першого покоління (F_1) з бажаними характеристиками.

Крім типових аспектів і варіантів здійснення винаходу, описаних вище, додаткові аспекти і варіанти здійснення будуть очевидні у світлі подальших описів.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фіг. 1 включає діаграму нелінеаризованої плазміді pDAB3831.

Фіг. 2 включає послідовність ДНК плазміді pDAB3831. Фрагмент ДНК від 7666 і до 3870 п.о. був ампліфікований за допомогою ПЛР і використаний для трансформації *Arabidopsis*, що дало рослини T_2 зі стабільно вбудованою вставкою.

Фіг. 3 включає вирівнювання послідовностей між послідовністю ДНК фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (PAT) із трансформованого за допомогою Dendrimer геному *Arabidopsis* і послідовністю PAT з бази даних NCBI.

Фіг. 4 включає вирівнювання послідовностей між геномом *Arabidopsis*, трансформованого послідовністю ДНК жовтого флуоресцентного білка (YFP), і послідовністю YFP з бази даних NCBI.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 являє собою послідовність прямого праймера, використовуваного для ампліфікації повнорозмірної експресійної касети 4,6 т.п.о. на плазміді pDAB3831: /5Biosq/TGAAAGTGTACATCAACGAA.

SEQ ID NO:2 являє собою послідовність зворотного праймера, використовуваного для ампліфікації повнорозмірної експресійної касети 4,6 т.п.о. на плазміді pDAB3831: /5Biosq/CCGCAACTATTTCAACAC.

SEQ ID NO:3 являє собою послідовність прямого праймера, використовуваного для ампліфікації гена YFP: TGTTCCACGGCAAGATCCCCCTACG.

SEQ ID NO:4 являє собою послідовність зворотного праймера, використовуваного для ампліфікації гена YFP: TATTCATCTGGGTGTGATCGGCCA.

SEQ ID NO:5 являє собою послідовність прямого праймера, використовуваного для ампліфікації гена PAT: GGAGAGGAGACCAGTTGAGATTAG.

SEQ ID NO:6 являє собою послідовність зворотного праймера, використовуваного для ампліфікації гена PAT: AGATCTGGGTAACATGGCCTAACTG.

ВАРІАНТИ ЗДІЙСНЕННЯ ВІНАХОДУ

I. Загальний опис декількох варіантів здійснення винаходу

Способи за винаходом, які дозволяють неінвазивне перенесення генів, можуть бути дуже корисні для одержання генетично модифікованих рослин з бажаними ознаками. Неінвазивне перенесення генів може полегшувати спрямований вплив і редагування молекулярних сайтів у клітині для областей, таких як включення бажаних вхідних даних, вихідних даних і агрономічних ознак у сільськогосподарські рослини. Описані способи також можуть бути корисні як такої, що "не містить ГМО" можливості транз'єнтної трансформації рослин, експансії технології інтрогресії ознак і стійкості до захворювань на деревні й овочеві культури, технології для яких на даний момент обмежені.

У нещодавній патентній заявці (США, серійний номер 60/978,059) продемонстрований неінвазивний засіб доставки ДНК на основі наночастинок з використанням наночастинок з різним корисним навантаженням, *inter alia*, для доставки кільцевої плазмідної ДНК, і однозначно продемонстроване стабільне вбудовування трансгенів у насіння T_1 рослин *Arabidopsis*. Одержані в ході цього трансгенні рослини, що містять кільцеву плазмідну ДНК, виявляли бажані фенотипи переносимості гербіциду і показували високий ступінь переносимості щонайменше при 4 послідовних обприскуваннях застосуванням у сільському господарстві рівнем глүфосинату амонію. У патенті США із серійним номером 60/978,059 була продемонстрована, *inter alia*, генетична трансформація *Arabidopsis* за допомогою позитивно заряджених золотих наночастинок з використанням кільцевої плазмідної ДНК. У даному дослідженні описане, *inter alia*, використання молекул функціоналізованих лінійних нуклеотидних касет для стабільної генетичної трансформації рослин.

У патенті США із серійним номером 60/978,059 описана, *inter alia*, опосередкована позитивно зарядженими наночастинами доставка плазмідної ДНК. Однак до цього моменту демонстрація стабільної геномної інтеграції трансгена з використанням доставки лінійної плазмідної не була опублікована. У даному винаході описане застосування опосередкованої наночастинами доставки молекул функціоналізованих лінійних нуклеотидних касет для стабільної генетичної трансформації в рослинах. Молекулярний аналіз показав експресію PAT разом з YFP у трансгенних рослинах T_1 *Arabidopsis*, трансформованих геном *pat* і геном *yfp* способами за винаходом. Трансгенні рослини T_1 є фертильними і дають насіння. Це насіння можна розмножити і можна провести сегрегаційний аналіз разом з молекулярним і чистовим аналізами.

У даному документі розкриті способи, які дозволяють одержати прості події інтеграції ДНК у рослини і, таким чином, спростити наступні спроби інтрогресії. Використання молекул функціоналізованих лінійних нуклеотидних касет забезпечує переваги в генетичній трансформації в порівнянні, наприклад, із плазмідами. Наприклад, молекули функціоналізованих лінійних нуклеотидних касет можуть не містити векторних каркасних послідовностей або селектованих маркерних генів.

II. Терміни

У нижченаведених описі і таблицях використовується ряд термінів. З метою забезпечення ясного і узгодженого розуміння опису і формули винаходу, включаючи обсяг, що дається в цих термінах, наведені наступні визначення.

Поворотне схрещування: у контексті даного винаходу поворотне схрещування являє собою процес, при якому селекціонер багаторазово схрещує гібридне потомство з одним з батьків, наприклад перше покоління гібридів F_1 з одним з батьківських генотипів гібриду F_1 .

Зародок: у контексті даного винаходу "зародок" може стосуватися маленької рослини, що міститься в зрілому насінні.

Наночастинка: у контексті даного винаходу "наночастинка" може стосуватися мікроскопічної частинки з розмірами в нанодіапазоні, наприклад менше 100 нм. Наночастинки, придатні для

використання в даному винаході, можуть мати розмір від 1 нм до 0,84 мкм. Одним класом наночастинок є "квантові точки" (QD). Квантова точка може мати медіанний діаметр 1-10 нм, наприклад 2-4 нм. Інші варіанти наночастинок включають, без обмеження: золоті наночастинки, покриті золотом наночастинки, пористі наночастинки, мезопористі наночастинки, кремнієві наночастинки, полімерні наночастинки, такі як дендримери, вольфрамові наночастинки, желатинові наночастинки, нанооболонки, наноядра, наносфери, нанотрубочки, магнітні наночастинки і їх комбінації.

З доступних наночастинок, найбільш продемонстроване застосування в біовізуалізації і біосенсорних технологіях люмінесцентних напівпровідникових нанокристалів (QD). Їх застосування ґрунтується на комбінації унікальних фотофізичних характеристик і розмірів, порівнянних з розмірами великих білків. Гідродинамічний радіус гідрофільних варіантів квантових точок CdSe-ZnS варіює від 5 нм (для нанокристалів, із групами на поверхні, заміщеними на молекулярні ліганди) до 20 нм для нанокристалів, поміщених у блок-співполімери. Одна QD може бути кон'югована з декількома біомолекулами (наприклад, антитілами, пептидами і молекулами нуклеїнових кислот), щоб забезпечити поліфункціональні біокон'югати QD з підвищеною авідністю. На доповнення, їх сильна стійкість до хімічної і фотодеградації може потенційно дозволяти тривале флуоресцентне спостереження специфічних біологічних процесів. Nie and Emory (1997), *Science*, 275:1102-6. Для того, щоб одержати поліфункціональні біокон'югати QD, стабільні навіть у внутрішньоклітинному оточенні, можна одночасно застосовувати на одному комплексі множини схем нековалентної кон'югації на основі металоафінного самозбирання і зв'язування біотину з авідіном без необхідності додаткового очищення. Yezhelyev et al. (2008), *J. Am. Chem. Soc.* 130(28):9006-12. Використовуючи в середньому 10 YFP плюс номінально 50 проникаючих у клітину пептидів (CPP) на QD, можна здійснити внутрішньоклітинну доставку білків з молекулярною вагою щонайменше 300 кДа і розміром 150 ангстрем. Ід. Кон'югати QD-b-PE доставляють "вантаж" у набагато більшому діапазоні розмірів і молекулярних ваг; наприклад, із середнім співвідношенням 2,5 стрептавідин-b-PE на кон'югат речовини, що доставляються, мають молекулярну вагу, що перевищує 103 кДа, і загальний розмір, що наближається до 500 ангстремів. Молекулярна вага і розмір можуть значно збільшуватися при використанні кон'югатів з великими валентностями b-PE.

Молекула нуклеїнової кислоти: полімерна форма нуклеотидів, яка може включати як смисловий, так і антисмисловий ланцюги РНК, кДНК, геномної ДНК, штучні хромосоми (ACI) і синтетичні форми і змішані полімери перерахованого вище. Нуклеотид стосується рибонуклеотиду, дезоксирибонуклеотиду або модифікованої форми нуклеотиду будь-якого типу. У контексті даного винаходу "молекула нуклеїнової кислоти" є синонімом "нуклеїнової кислоти" і "полінуклеотиду". Якщо не зазначене інше, то молекула нуклеїнової кислоти звичайно має довжину щонайменше 10 основ. Термін включає одно- і дволанцюжкові форми ДНК. Молекула нуклеїнової кислоти може включати будь-які або всі природні і модифіковані нуклеотиди, з'єднані один з одним природними і/або неприродними нуклеотидними зв'язками.

Функціонально зв'язаний: перша нуклеотидна послідовність функціонально зв'язана з другою нуклеотидною послідовністю, коли перша нуклеотидна послідовність функціонально взаємозв'язана з другою нуклеотидною послідовністю. Наприклад, промотор функціонально зв'язаний з кодуючою послідовністю, якщо промотор впливає на транскрипцію або експресію кодуючої послідовності. При рекомбінантному одержанні функціонально зв'язані нуклеотидні послідовності можуть бути неперервними і, при необхідності з'єднання двох кодуючих білки областей, можуть мати одну рамку зчитування. Однак нуклеїнові кислоти не повинні бути неперервними для того, щоб бути функціонально зв'язаними.

ПЕГильований: у контексті даного винаходу термін "ПЕГильований" може стосуватися наночастинок (наприклад, золотих наночастинок і квантових точок), поверхня яких модифікована поліетиленгліколем (ПЕГ) для поліпшення біосумісності. ПЕГильовані наночастинки можуть бути додатково покриті різними лігандами спрямованої дії, наприклад пептидами й антитілами, для збільшення ефективності доставки у визначені клітини і тканини. ПЕГ кон'югований з наночастишками з різними лікарськими сполуками, ліпосомами і полімерними міцелами, наприклад, для того, щоб збільшити час знаходження в кровотоку наночастинок, що мають оболонку, за рахунок зниження неспецифічної адсорбції білків внаслідок ефекту стеричної стабілізації.

Квантова точка: у контексті даного винаходу "квантова точка" (QD) (також іноді іменована нанокристалом) може стосуватися напівпровідникової наноструктури, яка обмежує рух електронів зони провідності, дірок валентної зони або екситонів (зв'язаних пар електронів зони провідності і дірок валентної зони) у всіх трьох вимірах. Це обмеження може бути наслідком,

наприклад, електростатичних потенціалів (генерованих зовнішніми електродами, допущанням, деформацією, домішками і т. д.); присутності поверхні розділу між різними напівпровідниковими матеріалами (наприклад, у нанокристалічних системах "ядро-оболонка"); присутності напівпровідникової поверхні (наприклад, напівпровідниковий нанокристал) або їх комбінації.

5 Квантова точка може мати дискретний (квантований) енергетичний спектр. Придатні хвильові функції можуть бути просторово локалізовані в квантовій точці, але поширюються на множину періодів кристалічної решітки. Квантова точка містить маленьке кінцеве число (наприклад, порядку 1-100) електронів зони провідності, дірок валентної зони або екситонів (тобто кінцеве число елементарних електричних зарядів).

10 Квантові точки являють собою особливий клас напівпровідникових матеріалів, які можуть бути кристалами, що складаються з речовин, які належать до груп II-VI, III-V або IV-VI періодичної системи елементів Менделєєва. Їх розміри можуть варіювати в діапазоні, наприклад, від 2 до 10 нанометрів (10-50 атомів) у діаметрі. У деяких варіантах здійснення винаходу квантові точки можуть бути виготовлені з ядром із селеніду кадмію й оболонкою із сульфіду цинку (CdSe/ZnS) і мають спектр корисних електричних і оптичних властивостей, які

15 відрізняються по характеристиках від властивостей вихідних речовин. Квантові точки досліджували як візуалізуючі агенти *in vivo* і *in vitro* внаслідок їх високого квантового виходу, високого молярного коефіцієнта екстинкції і високої стійкості до фотознебарвлення.

20 Стійкий до гліфосату: стійкість до дози гліфосату стосується здатності рослини вижити (тобто рослина може не вмирати) при впливі дози гліфосату. У деяких випадках стійкі рослини можуть тимчасово набути жовтого забарвлення або як-небудь інакше виявляти викликане гліфосатом ураження (наприклад, надлишкова кількість паростків і/або інгібування росту), але відновлюватися.

25 Стабілізований: у контексті даного винаходу термін "стабілізований" може стосуватися характеристик рослини, які відтворювано передаються від одного покоління до іншого покоління інбредних рослин одного сорту.

Трансген: у контексті даного винаходу термін "трансген" може стосуватися послідовності екзогенної нуклеїнової кислоти. В одному прикладі трансгеном є послідовність гена (наприклад, гена стійкості до гербіциду); гена, що кодує промислово або фармацевтично корисну сполуку;

30 або гена, що кодує бажану арготехнічну ознаку. У ще одному прикладі трансгеном є послідовність антисмислової нуклеїнової кислоти, причому експресія послідовності антисмислової нуклеїнової кислоти інгібує експресію послідовності нуклеїнової кислоти-мішені. Трансген може містити регуляторні послідовності, функціонально зв'язані з трансгеном (наприклад, промотор). У деяких варіантах здійснення винаходу молекула, що представляє

35 інтерес, функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що вводиться за допомогою опосередкованої наночастинками трансформації, містить трансген. Однак в інших варіантах здійснення винаходу, коли бажані додаткові геномні копії послідовності ендегенної нуклеїнової кислоти, молекула, що представляє інтерес, функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети містить послідовність ендегенної нуклеїнової кислоти, або вона містить нуклеотидну

40 послідовність, що знаходиться в антисмисловій орієнтації відносно молекули нуклеїнової кислоти-мішені в організмі-хазяїні.

Поглинання: у контексті даного винаходу термін "поглинання" може стосуватися переміщення частинки, такої як наночастинка (наприклад, квантові точки або наночастинки золота), через клітинну стінку або клітинну мембрану, причому переміщення не відбувається

45 винятково в результаті імпульсу, наданого частинці чим-небудь крім клітини, що поглинає частинку. Необмежувальними прикладами пристроїв або способів, які викликають переміщення частинки через клітинну стінку або клітинну мембрану винятково в результаті імпульсу, наданого частинці, є біолістичні пристрої, генна гармата, мікроін'єкція і/або методики імпафєкції.

50 III. Доставка молекул нуклеїнових кислот з використанням наночастинок для стабільної трансформації рослинних клітин

A. Загальний опис

У цьому винаході описані, наприклад, нові способи трансформації рослин з використанням опосередкованого наночастинок перенесення молекул функціоналізованих лінійних

55 нуклеотидних касет для генетичної трансформації й одержання стабільних трансгенних рослин. У способах за деякими варіантами здійснення винаходу може бути запропоновано не тільки швидке створення трансгенного організму, але також декілька можливостей бажаних генетичних модифікацій у порівнянні з іншими способами трансформації. Варіанти здійснення даного винаходу привели в результаті до вперше опублікованої стабільно трансформованої

60 рослини, одержаної за допомогою опосередкованої наночастинок доставки лінеаризованої

плазмідної ДНК. Розкриті способи генетичної модифікації відрізняються від традиційних способів генетичної трансформації рослин, не залежать від біолістичної доставки і можуть бути дуже корисні для створення трансгенних сільськогосподарських культур.

Трансгенні рослини звичайно одержують *Agrobacterium*-опосередкованою трансформацією або бомбардуванням частинками. На доповнення до гена, що представляє інтерес, трансгенні рослини часто обов'язково містять послідовності векторного каркаса і гени селектованого маркера, наприклад, які надають резистентності до антибіотиків або гербіцидів. Оскільки гени селектованих маркерів і векторних каркасних послідовностей є як зайвими, так і небажаними в методиках перенесення ДНК, то одержання вільних від вектора трансгенних рослин є переважним. Видалення векторних каркасних послідовностей, що дозволяють способи за деякими варіантами здійснення, може обмежити число гомологічних рекомбінацій і вплив елементів, що викликають рекомбінацію, на процес інтеграції.

У варіантах здійснення даного винаходу може бути досягнуте пряме створення трансгенних рослин за допомогою неінвазивної опосередкованої наночастинками доставки лінійних нуклеотидних касет, наприклад за допомогою способу занурення квітки. Такі способи можуть забезпечити більш простий шлях проведення бажаних трансформацій рослин відносно інших способів, доступних у даній галузі. У деяких варіантах здійснення винаходу способи можна використовувати для створення вільних як від вектора, так і від маркера трансгенних рослин. У деяких варіантах здійснення винаходу способи трансформації не залежать від культури тканин і тому можуть бути більш зручні і доцільні для рослин, відтворених статевим розмноженням.

У деяких варіантах здійснення способи за винаходом можуть забезпечувати здатність неінвазивно трансформувати не сумісні з *Agrobacterium* рослини і/або їх клітини в суспензійній культурі. Такі способи можуть забезпечити величезні можливості. Бажані вхідні дані й агротехнічні ознаки можуть вимагати доставки множини генів в одній процедурі трансформації. У деяких варіантах здійснення способи за винаходом дозволяють доставку молекул множини нуклеїнових кислот, одночасно усуваючи необхідність конструювання великих плазмід, які містять усі гени, що представляють інтерес, що може бути обтяжливо, якщо взагалі можливо.

В. Молекули нуклеїнових кислот

З появою методик молекулярної біології, які дозволили виділення і характеристику генів, що кодують визначені білкові або РНК-продукти (наприклад, інтерферуючі РНК ("РНКі")), вчені в галузі біології рослин стали зацікавлені в генетичній модифікації геному клітин для включення в нього чужорідних генів і їх експресії або додаткових або модифікованих версій природних або ендогенних генів (іноді регульованих різними промоторами), наприклад, з метою зміни ознак клітини певним чином. Такі чужорідні додаткові і/або модифіковані гени узагальнено іменуються в даному документі "трансгенами". Трансгени можуть, наприклад, кодувати білок, що представляє інтерес, або можуть транскрибуватися в РНКі. За останні п'ятнадцять-двадцять років були розроблені декілька способів одержання трансгенних клітин, і в конкретних варіантах здійснення даний винахід стосується трансформованих версій клітин і способів їх одержання за допомогою введення в рослинну клітину, що має клітинну стінку, однієї або декількох молекул функціоналізованих нуклеотидних касет за допомогою поглинання наночастинки через клітинну стінку. У деяких варіантах здійснення винаходу трансген може міститися в синтезованій лінійній ДНК-касеті.

Трансформація клітин може включати в себе молекулу нуклеїнової кислоти, що містить ген під контролем або функціонально зв'язаний з регуляторним елементом (наприклад, промотором, енансером, послідовністю термінації або їх комбінацією). Таким чином, молекула нуклеїнової кислоти може містити одну або декілька таких функціонально зв'язаних комбінацій гена і регуляторного елемента.

У варіантах здійснення винаходу молекулою, що представляє інтерес, нуклеїнової кислоти може бути молекула функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети. Молекули функціоналізованих лінійних нуклеотидних касет можна одержати, наприклад, розщепленням кільцевої плазмиди щонайменше однією рестрикційною ендонуклеазою так, щоб вирізати експресійну касету, що міститься в ній. Рестрикційні ендонуклеази будуть розщеплювати плазмиду по одному або декількох сайтах рестрикції в нуклеотидній послідовності плазмиди. Тому, плазмиди можна конструювати таким чином, щоб дозволити створення однієї або декількох визначених молекул лінійних нуклеотидних касет шляхом розщеплення за допомогою щонайменше однієї конкретної рестрикційної ендонуклеази. В альтернативному варіанті, в даній нуклеотидній послідовності плазмиди можна провести пошук сайтів, упізнаних однією або декількома конкретними рестрикційними ендонуклеазами, що дозволить одержати одну або декілька визначених молекул лінійних нуклеотидних касет. Шляхом відбору сайтів рестрикції, що знаходяться у визначених місцях у кільцевій плазміді або лінійній молекулі нуклеїнової

кислоти, можна одержати в результаті молекули лінійних нуклеотидних касет, у яких відсутні одна або декілька послідовностей з молекули нуклеїнової кислоти-попередника. Наприклад, можна одержати молекулу лінійної нуклеотидної касети, у якій відсутні сторонні нуклеотидні послідовності (наприклад, векторний каркас, селектовані маркери, такі як маркери для селекції в бактеріях, і непотрібні нуклеотидні послідовності, гомологічні геномній ДНК клітини-мішені). В альтернативному варіанті можна синтезувати молекулу лінійної нуклеотидної касети, у якій відсутні сторонні нуклеотидні послідовності.

Молекули лінійних нуклеотидних касет можна синтезувати з використанням проточних термоциклічних систем. Див. міжнародну публікацію PCT, WO 2008/045288. Замість використання маленьких пробірок, у проточних термоциклерах для ампліфікації ДНК використовують постійний або безперервний потік рідини, який багаторазово проходить через різні температурні зони. ПЛР-суміш вводять у рідину-носії, з якою вона не змішується, і потім рідину-носії проходить через множину температурних зон для здійснення ампліфікації ДНК у ПЛР-суміші. Специфічна послідовність ДНК у зразку ампліфікується в міру циклів її проходження через температурні зони. ПЛР-продукт можна очистити на гель-фільтраційній колонці.

Молекули нуклеїнових кислот можна кон'югувати з наночастинками, використовуючи різні реагенти з різними функціональними групами. Різні хімічні реакції для кон'югування молекул нуклеїнових кислот з наночастинками перераховані в таблиці 1.

Таблиця 1

Частинка	Поверхневі групи
QT, функціоналізовані PDDA, 620 нм	$N^+(CH_3)_2Cl^-$
QT, функціоналізовані аміногрупами, 620 нм	аміногрупи
QT, функціоналізовані стрептавідином, 620 нм	стрептавідин
меркаптооцтова кислота, $HSCH_2COOH$	карбоксильна і тиольна групи
3-меркаптопропіонімідату гідрохлорид (імінотіолан)	сульфгідрильна група

У варіантах здійснення винаходу, у яких молекула, що представляє інтерес, лінійної нуклеотидної касети містить один або декілька генів, гени можуть являти собою домінуючий або рецесивний алель. Наприклад, ген(и) може (можуть) надавати такі ознаки, як стійкість до гербіцидів, стійкість до комах, чоловіча фертильність, чоловіча стерильність, поліпшені живильні якості і промислове використання. Гени, що надають ці й інші ознаки, відомі в даній галузі, і відповідно до способів за винаходом будь-який ген можна ввести в рослинну клітину, що містить клітинну стінку.

Експресійні вектори для лінеаризації і поглинання за допомогою наночастинок: маркерні гени

Експресійні вектори для лінеаризації і поглинання за допомогою наночастинок можуть необов'язково включати щонайменше один генетичний маркер, наприклад, функціонально зв'язаний з регуляторним елементом, що дозволяє трансформованим клітинам, які містять маркер, вижити або при негативній селекції (наприклад, інгібуванні росту клітин, що не містять ген селектованого маркера), або при позитивній селекції (наприклад, скринінгу продукту, кодованого генетичним маркером). У даній галузі добре відома множина селектованих маркерних генів для трансформації, які включають, наприклад, без обмеження: гени, які кодують ферменти, метаболічно нейтралізуючі селективний хімічний агент, що може являти собою антибіотик або гербіцид; або гени, які кодують змінену мішень, що може бути нечутлива до інгібітору. У даній галузі також відомі способи специфічної позитивної селекції. Однак у деяких варіантах здійснення винаходу молекули лінеаризованих нуклеотидних касет не містять маркерних генів.

Одним селектованим маркерним геном, який може бути придатний для трансформації рослин визначеними нуклеотидними молекулами, є ген неоміцинфосфотрансферази II (nptII), необов'язково, під контролем регуляторних сигналів рослин, який надає стійкості до канаміцину. Див., наприклад, Fraley et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:4803. Іншим геном селектованого маркера, який можна використовувати, є ген гіроміцинфосфотрансферази, який надає стійкості до антибіотика гіроміцину. Див., наприклад, Vanden Elzen et al. (1985), Plant Mol. Biol. 5:299.

Додаткові гени селектованих маркерів, які можна використовувати в способах за винаходом, включають гени бактеріального походження, наприклад, які надають стійкості до антибіотиків, такі як гени гентаміцинацетилтрансферази, стрептоміцинфосфотрансферази, аміноглікозид-3'-аденілтрансферази, і стійкості до блеоміцину. Див., Hayford et al. (1988), Plant Physiol. 86:1216;

Jones et al. (1987), *Mol. Gen. Genet.* 210:86; Svab et al. (1990), *Plant Mol. Biol.* 14:197; i Hille et al. (1986), *Plant Mol. Biol.* 7:171. Інші гени селектованих маркерів можуть надавати стійкості до гербіцидів, таких як гліфосат, глюфосинат або бромоксиніл. Див. Comai et al. (1985), *Nature*, 317:741-744; Gordon-Kamm et al. (1990), *Plant Cell*, 2:603-618; i Stalker et al. (1988), *Science*, 242:419-423.

Гени інших селектованих маркерів, які можна використовувати в способах за винаходом, включають гени небактеріального походження. Ці гени включають, наприклад, без обмеження, гени мишачої дигідрофолатредуктази, рослинної 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтетази і рослинної ацетолактатсинтетази. Див. Eichholtz et al. (1987), *Somatic Cell Mol. Genet.* 13:67; Shah et al. (1986), *Science*, 233:478; i Charest et al. (1990), *Plant Cell Rep.* 8:643.

Для іншого класу маркерних генів, придатних для трансформації рослин, може знадобитися скринінг передбачувано трансформованих клітин рослини, а не пряма генетична селекція трансформованих клітин на стійкість до токсичної речовини, такої як антибіотик. Ці гени особливо корисні для кількісної оцінки або візуалізації просторової картини експресії гена у визначених тканинах і їх часто іменують "репортерними генами", тому що для дослідження експресії гена їх можна злити з геном або регуляторною послідовністю гена. Звичайно використовувані гени для скринінгу трансформованих клітин включають, без обмеження, β -глюкуронідазу (GUS), β -галактозидазу, люциферазу і хлорамфеніколтрансферазу. Див. Jefferson (1987), *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387; Teeri et al. (1989), *EMBO J.* 8:343; Koncz et al. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:131; i DeBlock et al. (1984), *EMBO J.* 3:1681. Нещодавно стали доступні *in vivo* способи візуалізації активності GUS, що не вимагають руйнування тканини рослини. Публікація *Molecular Probes* 2908 (1993), *Image Green™*, pp. 1-4; i Naleway et al. (1991), *J. Cell Biol.* 115:151a.

Зовсім нещодавно як маркери експресії генів у прокаріотичних і еукаріотичних клітинах стали використовувати гени, що кодують флуоресцентні білки (наприклад, GFP, EGFP, EBFP, ECFP і YFP). Див. Chalfie et al. (1994), *Science*, 263:802. Таким чином, флуоресцентні білки і мутації флуоресцентних білків можна використовувати як скриновані маркери у деяких варіантах здійснення винаходу.

Експресійні вектори для поглинання за допомогою наночастинок: промотори

Гени, включені в молекули лінійних нуклеотидних касет, можуть, необов'язково, керуватися нуклеотидною послідовністю, що містить регуляторний елемент, наприклад промотор. В галузі трансформації на сьогоднішній момент добре відомі декілька типів промоторів, а також інші регуляторні елементи, які можна використовувати індивідуально або разом із промоторами.

Промотор являє собою область ДНК, яка може розташовуватися вище початку транскрипції, і може брати участь у впізнаванні і зв'язуванні РНК-полімерази і/або інших білків для ініціації транскрипції. "Рослинним промотором" може бути промотор, здатний ініціювати транскрипцію в рослинних клітинах. Приклади промоторів, які залежать від стадії розвитку рослин, включають промотори, що переважно ініціюють транскрипцію у визначених тканинах, таких як листи, корені, насіння, волокна, судини ксилеми, трахеїди або склеренхіма. Такі промотори відносять до тканинопереважних. Промотори, які ініціюють транскрипцію тільки у визначених тканинах, відносять до тканиноспецифічних. Специфічний до типу клітини промотор, у першу чергу, керує експресією у визначених типах клітин в одному або декількох органах, наприклад у судинних клітинах у коренях або листах. Індуцибельним промотором може бути промотор, який може знаходитися під контролем навколишнього середовища. Приклади умов навколишнього середовища, які можуть впливати на транскрипцію, керовану індуцибельними промоторами, включають, без обмеження, анаеробні умови або наявність освітлення. Тканиноспецифічні, тканинопереважні, специфічні до типу клітини і індуцибельні промотори складають клас "неконститутивних" промоторів. "Конститутивний" промотор є промотором, що може бути активним у більшості умов навколишнього середовища.

1. Індуцибельні промотори

Індуцибельний промотор може бути функціонально зв'язаний з геном, призначеним для експресії в клітині. Необов'язково, індуцибельний промотор може бути функціонально зв'язаний з нуклеотидною послідовністю, що кодує сигнальну послідовність, яка може бути функціонально зв'язана з геном, призначеним для експресії в клітині. З індуцибельним промотором швидкість транскрипції збільшується у відповідь на дію індукуючого агента.

У даному винаході можна використовувати будь-який індуцибельний промотор. Див. Ward et al. (1993), *Plant Mol. Biol.* 22:361-366. Типові індуцибельні промотори включають, без обмеження, промотори, одержані з ACEI-системи, що відповідають на присутність іонів міді (Mett et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:4567-71); промотор гена *ln2* з маїсу, що відповідає за переносимість бензолсульфамідного гербіциду (Hershey et al. (1991), *Mol. Gen*

Genetics, 227:229-237; і Gatz et al. (1994), Mol. Gen. Genetics, 243:32-38); і промотор Tet-репресора з Tn10 (Gatz et al. (1991), Mol. Gen. Genetics, 227:229-237). Особливо придатним індукцибельним промотором може бути промотор, що відповідає на індукуючий агент, на який рослини звичайно не відповідають. Таким типовим індукцибельним промотором є індукцибельний промотор з гена стероїдного гормону, транскрипційна активність якого може індукуватися глюкокортикостероїдним гормоном. Schena et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:0421.

2. Конститутивні промотори

Конститутивний промотор може бути функціонально зв'язаний з геном, призначеним для експресії в клітині, або конститутивний промотор може бути функціонально зв'язаний з нуклеотидною послідовністю, що кодує сигнальну послідовність, яка може бути функціонально зв'язана з геном, призначеним для експресії в клітині.

У варіантах здійснення даного винаходу можна використовувати різні конститутивні промотори. Типові конститутивні промотори включають без обмеження: промотори з вірусів рослин, такі як, але не обмежені ними, промотор 35S з CaMV (Odell et al. (1985), Nature, 313:810-812); промотори генів актину з рису (McElroy et al. (1990), Plant Cell, 2:163-171); промотор убіквітину (Christensen et al. (1989), Plant Mol. Biol. 12:619-632; і Christensen et al. (1992), Plant Mol. Biol. 18:675-689); pEMU (Last et al. (1991), Theor. Appl. Genet. 81:581-588); MAS (Velten et al. (1984), EMBO J. 3:2723-2730); промотор гістону H3 кукурудзи (Lepetit et al. (1992), Mol. Gen. Genetics, 231:276-285; і Atanassova et al. (1992), Plant Journal 2 (3):291-300); і ALS-промотор, XbaI/NcoI-фрагмент у 5'-напрямку від структурного гена ALS3 Brassica napus (або нуклеотидна послідовність, аналогічна зазначеному XbaI/NcoI-фрагменту). Див. міжнародну публікацію PCT WO 96/30530.

3. Тканиноспецифічні або тканинопереважні промотори

Тканиноспецифічний промотор може бути функціонально зв'язаний з геном, призначеним для експресії в клітині. Необов'язково, тканиноспецифічний промотор може бути функціонально зв'язаний з нуклеотидною послідовністю, що кодує сигнальну послідовність, яка може бути функціонально зв'язана з геном, призначеним для експресії в клітині. Рослини, трансформовані геном, що представляє інтерес, функціонально зв'язаним із тканиноспецифічним промотором, можуть продукувати білковий продукт трансгена виключно або переважно у визначеній тканині.

У варіантах здійснення даного винаходу можна використовувати будь-який тканиноспецифічний або тканинопереважний промотор. Типові тканиноспецифічні або тканинопереважні промотори включають, без обмеження, переважно функціонуючий в коренях промотор, наприклад промотор гена фазеоліну (Murai et al. (1983), Science, 23:476-82; і Sengupta-Gopalan et al. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3320-4); специфічно функціонуючий у листах і індукований освітленням промотор, наприклад промотори генів *cab* або *rubisco* (Simpson et al. (1985), EMBO J. 4(11):2723-2729; і Timko et al. (1985), Nature, 318:579-82); специфічно функціонуючий у пиляках промотор, наприклад промотор гена LAT52 (Twell et al. (1989), Mol. Gen. Genetics, 217:240-5); специфічно функціонуючий у пилку промотор, наприклад промотор гена Zml3 (Guerrero et al. (1993), Mol. Gen. Genetics, 244:161-8); або переважно функціонуючий у мікроспорах промотор, наприклад промотор гена *arg* (Twell et al. (1993), Sex. Plant Reprod. 6:217-24).

Транспорт білка, продукowanego трансгенами, у субклітинний компартмент, такий як хлоропласт, вакуоль, пероксисома, гліоксисома, клітинна стінка або мітохондрія, або з метою секреції в апопласт, можна здійснити за допомогою функціонального зв'язування нуклеотидної послідовності, що кодує сигнальну послідовність, з 5' і/або 3'-областю гена, який кодує білок, що представляє інтерес. Такі "направляючі" послідовності на 5'- і/або 3'-кінці гена можуть визначати, наприклад, під час синтезу і процесингу білка, клітинний компартмент, у який в результаті надійде кодований білок. В альтернативному варіанті такі направляючі в субклітинний компартмент білки можуть бути прямо зв'язані з наночастинкою для того, щоб направити наночастинку, покриту молекулами, що представляють інтерес, нуклеїнових кислот, у бажаний субклітинний компартмент.

Присутність сигнальної послідовності направляє поліпептид або у внутрішньоклітинну органелу, або в субклітинний компартмент, або на секрецію в апопласт. У даній галузі відома множина сигнальних послідовностей. Див., наприклад, Becker et al. (1992), Plant Mol. Biol. 20:49; Close P.S., Master's Thesis, Iowa State University (1993); Knox et al. (1987), Plant Mol. Biol. 9:3-17; Lerner et al. (1989), Plant Physiol. 91:124-9; Fontes et al. (1991), Plant Cell, 3:483-96; Matsuoka et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:834; Gould et al. (1989), J. Cell. Biol. 108:1657; Creissen et al. (1991), Plant J. 2:129; Kalderon et al. (1984), Cell, 39:499-509; Steifel et al. (1990), Plant Cell. 2:785-93.

Гени чужорідних білків і агротехнічні гени

Трансгенні рослини по варіантах здійснення даного винаходу можуть продукувати чужорідний білок у комерційних кількостях. Таким чином, методики селекції і розведення трансформованих рослин дають множину трансгенних рослин, які збирають загальноприйнятим чином. Чужорідний білок потім можна екстрагувати з тканини, що представляє інтерес, або з загальної біомаси. Екстракцію білка з рослинної біомаси можна виконати відомими способами, які обговорюються, наприклад, у Heney and Orr (1981), Anal. Biochem. 114:92-6.

У деяких аспектах винаходу рослинним матеріалом, призначеним для комерційного одержання чужорідного білка, може бути рослина, тканина рослини або клітина рослини. У деяких аспектах біомасою, що представляє інтерес, може бути насіння рослини. Для трансгенних рослин, що показують більш високі рівні експресії, може бути створена генетична карта, наприклад, за допомогою загальноприйнятих RFLP-, ПЛП- і SSR-аналізів, які ідентифікують приблизне місце розташування на хромосомі вбудованої молекули ДНК. Приклади методик у цій галузі див. у Glick and Thompson, Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology CRC Press, Boca Raton, 269:284 (1993). Інформація про картування місця розташування на хромосомі може бути корисною, наприклад, для захисту патентованого об'єкта - трансгенної рослини, або для оцінки біологічної безпеки. При проведенні неправомочного розведення і здійснення схрещування з іншою зародковою плазмою, можна провести порівняння карти області інтеграції з аналогічними картами для підозрілих рослин для того, щоб визначити, чи мають останні загальне походження з рослиною - об'єктом захисту. Порівняння карт може включати в себе гібридизацію, RFLP, ПЛП, SSR і секвенування, які усі є загальноприйнятими методиками.

Аналогічним чином, агротехнічні гени можна експресувати у трансформованих клітинах або їх потомстві. Більш конкретно, рослини можна генетично модифікувати за допомогою способів за винаходом для експресії різних фенотипів, що представляють агротехнічний інтерес. Типові гени, які можна використовувати в цьому відношенні, включають, але не обмежені цим, гени, упорядковані по категоріях нижче.

1. Гени, що надають стійкості до шкідників або захворювань:

А) Гени стійкості до захворювань. Захисні властивості рослини часто активуються специфічною взаємодією між продуктом гена стійкості до захворювання (R) у рослині і продуктом відповідного гена авірулентності (Avr) у патогені. Сорт рослини можна трансформувати клонованими генами стійкості, щоб створити рослини, стійкі до визначених штамів патогену. Див., наприклад, Jones et al. (1994), Science, 266:789 (клонування гена томата Cf-9 для стійкості до *Cladosporium fulvum*); Martin et al. (1993), Science, 262:1432 (ген томата Pto для стійкості до *Pseudomonas syringae* pv. tomato кодує протеїніназу); Mindrinos et al. (1994), Cell, 78:1089 (ген RSP2 для стійкості до *Pseudomonas syringae*).

В) Ген, що надає стійкості до шкідників, наприклад цистоутворювальної нематоди сої. Див., наприклад, міжнародну публікацію PCT WO 96/30517 і міжнародну публікацію PCT WO 93/19181.

С) Білок *Bacillus thuringiensis*, його похідне або синтетичний поліпептид, змодельований на його основі. Див., наприклад, Geiser et al. (1986), Gene, 48:109 (клонування і нуклеотидна послідовність гена Bt δ-ендотоксину). Більше того, молекули ДНК, що кодують гени δ-ендотоксину, можна придбати в Американській Колекції Типових Культур (Manassas, VA), наприклад, під номерами доступу ATCC-40098, 67136, 31995 і 31998.

Д) Лектин. Див., наприклад, Van Damme et al. (1994), Plant Molec. Biol. 24:25 (нуклеотидні послідовності декількох генів манозозв'язувального лектину з *Clivia miniata*).

Е) Вітамінзв'язувальний білок, наприклад авідин. Див. міжнародну публікацію PCT US93/06487 (застосування авідину і гомологів авідину як ларвіцидів проти комах-шкідників).

Ф) Інгібітор ферменту, наприклад інгібітор протеази або протеїнази або інгібітор амілази. Див., наприклад, Abe et al. (1987), J. Biol. Chem. 262:16793 (нуклеотидна послідовність інгібітору цистеїнової протеїнази рису), Huub et al. (1993), Plant Molec. Biol. 21:985 (нуклеотидна послідовність кДНК, що кодує інгібітор І тютюнової протеїнази), Sumitani et al. (1993), Biosci. Biotech. Biochem. 57:1243 (нуклеотидна послідовність інгібітору альфа-амілази з *Streptomyces nitrosporeus*); і патент США № 5,494,813.

Г) Специфічний для комах гормон або феромон, наприклад ектистероїд і ювенільний гормон, їх варіант, міметик на їх основі або їх антагоніст або агоніст. Див., наприклад, Hammock et al. (1990), Nature, 344:458 (бакуловірусна експресія клонованої естерази ювенільного гормону, інактиватора ювенільного гормону).

Н) Специфічний для комах білок або нейропептид, який при експресії порушує фізіологію обробленого шкідника. Див., наприклад, Regan (1994), J. Biol. Chem. 269:9 (експресійне клонування дає ДНК, що кодує рецептор діуретичного гормону комах); і Pratt et al. (1989),

Biochem. Biophys. Res. Comm. 163:1243 (алостатин може бути ідентифікований у *Diploptera punctata*). Див. також патент США № 5,266,317 (гени, що кодують специфічні для комах паралітичні нейротоксини).

5 I) Специфічна для комах отрута, вироблювана в природі зміями, осаами або будь-яким іншим організмом. Див., наприклад, Pang et al. (1992), Gene, 116:165 (гетерологічна експресія в рослинах гена, що кодує токсичний для комах пептид скорпіона).

J) Фермент, відповідальний за гіперакумуляцію монотерпену, сесквітерпену, стероїду, гідроксамової кислоти, похідного фенілпропаню або іншої небілкової молекули з інсектицидною дією.

10 K) Фермент, що бере участь у модифікаційних процесах, включаючи посттрансляційну модифікацію біологічно активних молекул, наприклад гліколітичний фермент, протеолітичний фермент, ліполітичний фермент, нуклеаза, циклаза, трансаміназа, естераза, гідролаза, фосфатаза, кіназа, фосфорилаза, полімераза, еластаза, хітиназа або глюканаза, або природні, або синтетичні. Див. міжнародну публікацію PCT WO 93/02197 (нуклеотидна послідовність гена калази). Молекули ДНК, що містять кодуючі хітиназу послідовності, можна одержати, наприклад, з ATCC під номерами доступу 39637 і 67152. Див. також Kramer et al. (1993), Insect Biochem. Molec. Biol. 23:691 (нуклеотидна послідовність кДНК, що кодує хітиназу бражника тютюнового); і Kawalleck et al. (1993), Plant Molec. Biol. 21:673 (нуклеотидна послідовність гена *ubi4-2* поліубіквітину петрушки).

20 L) Молекула, що стимулює сигнальну трансдукцію. Див., наприклад, Botella et al. (1994), Plant Molec. Biol. 24:757 (нуклеотидні послідовності для кДНК-клонів кальмодуліну золотистої квасолі); і Griess et al. (1994), Plant Physiol. 104:1467 (нуклеотидна послідовність кДНК-клатону кальмодуліну кукурудзи).

25 M) Пептид з гідрофобним моментом. Див., наприклад, міжнародну публікацію PCT WO 95/16776 (пептидні похідні тахіплезину, що інгібують грибові патогени рослин); і міжнародну публікацію PCT WO 95/18855 (синтетичні антимікробні пептиди, що надають стійкості до захворювань).

30 N) Мембранна пермеаза, білок, що формує або блокує канали. Див. наприклад, Jaynes et al. (1993), Plant Sci, 89:43 (гетерологічна експресія аналога літичного пептиду цекропіну-β для надання трансгенним рослинам тютюну стійкості до *Pseudomonas solanacearum*).

35 O) Вірусний інвазивний білок або одержуваний з нього комплексний токсин. Наприклад, акумуляція білків оболонки вірусу в трансформованих клітинах рослини надає стійкості до вірусної інфекції і/або розвитку захворювання, що викликається вірусом, з якого одержаний ген білка оболонки, а також спорідненими вірусами. Див. Beachy et al. (1990), Ann. rev. Phytopathol. 28:451. Стійкість, опосередкована білком оболонки, була надана трансформованим рослинам проти вірусу мозаїки люцерни, вірусу мозаїки огірка, вірусу тютюнової смужки, X-вірусу картоплі, Y-вірусу картоплі, вірусу гравірування тютюну, вірусу погремковості тютюну і вірусу тютюнової мозаїки. Id.

40 P) Специфічне до комах антитіло або одержуваний з нього імунотоксин. Таким чином, антитіло, мішенню якого є критична метаболічна функція в комасі, може інактивувати фермент-мішень, убиваючи комаху. Див. Taylor et al., Abstract #497, Seventh Int'l Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions (Edinburgh, Scotland) (1994) (інактивація ферменту в трансгенному тютюні за допомогою продукції одноланцюжкових фрагментів антитіла).

45 Q) Специфічне до вірусу антитіло. Див., наприклад, Tavladoraki et al. (1993), Nature, 366:469 (трансгенні рослини, експресуючі гени рекомбінантного антитіла, захищені від зараження вірусом).

50 R) Зупиняючий розвиток білок, продукований у природі патогеном або паразитом. Наприклад, грибові енд-α-1,4-D-полігалактуронази сприяють колонізації грибків і вивільненню живильних речовин з рослини шляхом розчинення клітинної стінки гомо-α-1,4-D-галактуроназою. Див. Lamb et al. (1992), Bio/Technology, 10:1436. Див. також Toubart et al. (1992), Plant J. 2:367 (клонування і характеристика гена, що кодує білок-інгібітор ендополігалактуронази з квасолі).

55 S) Зупиняючий розвиток білок, продукований у природі рослиною. Див., наприклад, Logemann et al. (1992), Bio/Technology, 10:305 (трансгенні рослини, експресуючі ген інактивації рибосом з ячменю, мають підвищену стійкість до грибкових захворювань).

2. Гени, що надають стійкості до гербіциду:

60 A) Гербіцид, що інгібує точку росту або меристему, такий як імідазолінон або сульфонілсечовина. Типові гени в цій категорії кодують мутантний фермент ALS і AHAS, як описано, наприклад, Lee et al. (1988), EMBO J. 7:1241; і Miki et al. (1990), Theor. Appl. Genet. 80:449, відповідно.

В) Стійкість до гліфосату, що надається, наприклад, генами мутантної 5-енолпірувілшкімат-3-фосфатсинтетази (EPSP) (за допомогою введення рекомбінантних нуклеїнових кислот і/або різних форм *in vivo* мутагенезу нативних генів EPSP, генів *agoA* і генів гліфосатацетилтрансферази (GAT), відповідно); стійкість до інших фосфоносполук, що надається такими генами, як гени глюфосинатфосфінотрицинацетилтрансферази (PAT) з видів *Streptomyces*, включаючи *Streptomyces hygroscopicus* і *Streptomyces viridichromogenes*; і стійкість до піридинокси- або феноксипропіонових кислот і циклогексонів (надається генами, що кодують інгібітор АССази). Див., наприклад, патент США № 4,940,835 і патент США № 6,248,876 (нуклеотидні послідовності форм EPSP, що надають рослині стійкості до гліфосату). Молекулу ДНК, що кодує мутантний ген *agoA*, можна одержати в ATCC під номером доступу 39256. Див. також патент США № 4,769,061 (нуклеотидна послідовність мутантного гена *agoA*). У європейській патентній заявці № 0333033 і патенті США № 4,975,374 описані нуклеотидні послідовності генів глутамінсинтетази, що можуть надавати стійкості до гербіцидів, таких як L-фосфінотрицин. Нуклеотидні послідовності типових генів фосфінотрицинацетилтрансферази наводяться в Європейській патентній заявці № 0242246 і в DeGreef et al. (1989), *Bio/Technology*, 7:61 (одержання трансгенних рослин, які експресують химерні гени *bar*, що кодують білки з PAT-активністю). Приклади генів, які надають стійкості до феноксипропіонових кислот і циклогексонів, таких як сетоксидим і галоксифоп, включають гени Acc1-S1, Acc1-S2 і Acc1-S3, описані Marshall et al. (1992), *Theor. Appl. Genet.* 83:435. Гени GAT, здатні надавати стійкості до гліфосату, описані, наприклад, у WO 2005012515. Гени, що надають стійкості до 2,4-D-феноксипропіонової кислоти і піридилоксиауксинових гербіцидів, описані, наприклад, у WO 2005107437.

С) Гербіцид, інгібуючий фотосинтез, такий як триазин (*psbA* і *gs+*) або бензонітрил (ген нітрилази). Див., наприклад, Przibila et al. (1991), *Plant Cell*, 3:169 (трансформація *Chlamydomonas* плазмідами, що кодують мутантні гени *psbA*). Нуклеотидні послідовності генів нітрилази описані в патенті США № 4,810,648, і молекули ДНК, що містять ці гени, доступні під номерами доступу ATCC-53435, 67441 і 67442. Див. також Hayes et al. (1992), *Biochem. J.* 285:173 (клонування й експресія ДНК, що кодує глутатіон-S-трансферазу).

3. Гени, які надають ознаку, що збільшує прибуток, або додають у неї внесок, такі як:

А) Модифікований метаболізм жирних кислот, наприклад, шляхом трансформації рослини антисмисловим геном стеарил-АСР десатурази для збільшення вмісту стеаринової кислоти в рослині. Див. Knultzon et al. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:2624.

В) Знижений вміст фітату. Введення гена, що кодує фитазу, може підсилити розщеплення фітату, додаючи більше вільного фосфату в трансформовану рослину. Див., наприклад, Van Hartingsveldt et al. (1993), *Gene*, 127:87 (нуклеотидна послідовність гена фитази з *Aspergillus niger*). Можна ввести ген для зменшення вмісту фітату. У кукурудзі, наприклад, це можна виконати клонуванням і повторним введенням ДНК, асоційованої з одним алелем, що може відповідати за мутанти кукурудзи, які відрізняються низьким вмістом фітинової кислоти. Див. Raboy et al. (1990), *Maydica* 35:383.

С) Модифікований вуглеводний склад рослин, обумовлений, наприклад, трансформуванням рослин геном, який кодує фермент, що змінює схему розгалуження крохмалю. Див. Shiroza et al. (1988), *J. Bacteriol.* 170:810 (нуклеотидна послідовність гена мутантної фруктозилтрансферази з *Streptococcus*); Steinmetz et al. (1985), *Mol. Gen. Genet.* 20:220 (ген левансукрази); Pen et al. (1992), *Bio/Technology*, 10:292 (α -амілаза); Elliot et al. (1993), *Plant Molec. Biol.* 21:515 (нуклеотидні послідовності генів інвертази томата); Sogaard et al. (1993), *J. Biol. Chem.* 268:22480 (ген α -амілази ячменю); і Fisher et al. (1993), *Plant Physiol.* 102:1045 (фермент II розгалуження крохмалю ендосперму кукурудзи).

С. Наночастинки

Деякі варіанти здійснення винаходу стосуються способів введення молекули функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, у рослинну клітину, яка містить клітинну стінку. У деяких варіантах здійснення винаходу спосіб може включати здійснення контакту між наночастинками, покритими молекулою, що представляє інтерес, функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, і рослинною клітиною; і забезпечення можливості поглинання наночастинки через клітинну стінку. У конкретних варіантах здійснення винаходу наночастинка може оборотно або необоротно містити, бути покрита або як-небудь інакше зв'язана з молекулою, що представляє інтерес, функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети і/або нести її. У цих і додаткових варіантах здійснення винаходу наночастинка може бути функціоналізована групою, яка вступає в реакцію з групою на молекулі функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, для того, щоб одержати наночастинку, кон'юговану з молекулою функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє

інтерес. У деяких варіантах здійснення винаходу молекулу функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, можна ввести в наночастинки до контакту з рослинною клітиною, що має клітинну стінку, або одночасно з введенням наночастинки в рослинну клітину, що має клітинну стінку. Приклади наночастинок, які можна використовувати у варіантах здійснення даного винаходу, включають, без обмеження, квантові точки, інші напівпровідникові наночастинки, позитивно заряджені наночастинки, золоті наночастинки, покриті золотом наночастинки, пористі наночастинки, мезопористі наночастинки, кремнієві наночастинки, полімерні наночастинки, такі як дендримери, вольфрамові наночастинки, желатинові наночастинки, нанооболонки, наноядра, наносфери, нанотрубочки і магнітні наночастинки.

У конкретних варіантах здійснення винаходу поверхня наночастинки може бути функціоналізована, що може, наприклад, дозволяти спрямоване поглинання або може дозволяти оборотне або необоротне зв'язування інших речовин з поверхнею наночастинки. Як необмежуючий обсяг винаходу приклад, поверхня наночастинки (наприклад, квантової точки) могла б бути функціоналізована самозбираним моношаром, наприклад, алкантіолатів, які можна додатково функціоналізувати або одержати їх похідні. У додатковому необмежуючому обсяг винаходу прикладі, поверхню наночастинок можна модифікувати лінкерами, які самі можна додатково функціоналізувати або модифікувати, наприклад стрептавідином. В одному варіанті здійснення винаходу наночастинка може бути ПЕГильована. В інших варіантах здійснення винаходу наночастинка може містити або може бути поліфункціоналізована одним або декількома з ядра (активного або неактивного), стеричної оболонки (активної або інертної), розщеплюваної сполуки і/або направляючої молекули або ліганду.

У деяких варіантах здійснення винаходу наночастинкою може бути кон'югат стрептавідин-QD. Кон'югат стрептавідин-QD виготовлений з нанометрового кристала напівпровідникового матеріалу (CdSe), що покритий додатковою напівпровідниковою оболонкою (ZnS) для поліпшення оптичних властивостей матеріалу. Він має вузький симетричний спектр емісії з максимумом близько 605 нм. Ядро й оболонка додатково покриті полімерною оболонкою, яка дозволяє кон'югувати їх з біомолекулами і зберігати їх оптичні властивості. Ця полімерна оболонка прямо зв'язана зі стрептавідином. Кон'югат стрептавідину і QD має розмір великої макромолекули або білка (приблизно 15-20 нм). Поверхню підготовляли, щоб вона мала низький неспецифічний сигнал при інкубації зі зразками в різних водних буферах. Квантові точки можна з'єднати зі стрептавідином прямо за допомогою реакції зв'язування активованих складних ефірів. У результаті утворюється матеріал зі стрептавідином, ковалентно приєднаним до поверхні (звичайно 5-10 молекул стрептавідину на квантову точку в кон'югаті), що дає в результаті кон'югати стрептавідину і квантових точок з високоспецифічною біологічною активністю.

Відповідно до варіантів здійснення даного винаходу рослинною клітиною, що має клітинну стінку, може бути будь-яка рослинна клітина, що містить інтактну і цілу клітинну стінку. Приклади клітин, що мають клітинну стінку, включають, без обмеження: водорості, тютюн, моркву, кукурудзу, канолу, рапс, бавовник, пальму, арахіс, сою, цукрову тростину, *Oryza sp.*, *Arabidopsis sp.* і *Ricinus sp.* Варіанти здійснення винаходу можуть включати клітини, що містять клітинну стінку, з будь-якої тканини або будь-якого місця, де вони були знайдені, включаючи, без обмеження: зародки, меристемні клітини, калюс, пилки, включаючи гаплоїдні і подвійні гаплоїдні мікроспори, листи, пиляки, корені, кінчики коренів, квітки, насіння, стручки, стебла і культуру тканини.

У конкретних варіантах здійснення винаходу молекулою функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, може бути будь-яка молекула функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, яку можна доставити в рослинну клітину, що має клітинну стінку, за даним винаходом. Молекули функціоналізованих лінійних нуклеотидних касет, що представляють інтерес, можуть містити нуклеотидні послідовності, без обмеження: молекули ДНК, РНК, РНКі, гени, плазміди, косміди, YAC (дріжджові штучні хромосоми) і BAC (бактеріальні штучні хромосоми). Молекули функціоналізованих лінійних нуклеїнових кислот, що представляють інтерес, можуть бути введені в рослинну клітину, що має клітинну стіну, одночасно, наприклад, з наступними сполуками, без обмеження: поліпептидами, ферментами, гормонами, глікопептидами, цукрами, жирами, сигнальними пептидами, антитілами, вітамінами, месенджерами, вторинними месенджерами, амінокислотами, цАМФ, лікарськими сполуками, гербіцидами, фунгіцидами, антибіотиками і/або їх комбінаціями.

Наночастинки, такі як квантові точки, можна функціоналізувати з використанням ПЕГ, використовуючи протокол згідно з Dubertret et al. (2002), Science, 298:1759, або за вищевказаним протоколом, модифікованим відповідно до рішення досвідченого фахівця.

Наприклад, покриті ТОРО (триоктилфосфіноксидом) CdSe/ZnS-квантові точки можна ресуспендувати з ПЕГ-ПЕ в хлороформі з наступним випарюванням розчинника і солюбілізацією одержаних ПЕГильованих квантових точок у воді.

В аспектах винаходу наночастинки можуть бути поглинені різними частинами клітини. Приклади місць, які можуть поглинати наночастинки, включають без обмеження: цитозоль, ядро, тонопласти, пластиди, етіопласти, хромопласти, лейкопласти, елайопласти, протеїнопласти, амілопласти, хлоропласти і просвіт подвійної мембрани. В інших варіантах здійснення винаходу поглинання наночастинок рослинною клітиною, що містить клітинну стінку, може відбутися по симпластичному або апопластичному шляху.

D. Стабільно трансформовані рослинні клітини

Стабільно трансформованою рослинною клітиною за винаходом може бути будь-яка рослинна клітина, здатна трансформуватися з використанням молекули функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, шляхом опосередкованої наночастинками трансформації. Відповідно, рослинна клітина може бути виділена або культивована з дводольної або однодольної рослини. Рослинна клітина також може бути присутньою у тканині рослини або в цілій рослині. Необмежувальні приклади стабільно трансформованих рослинних клітин із дводольних рослин за винаходом включають: люцерну, квасолю, брокколі, капусту, моркву, цвітну капусту, селеру, китайську капусту, бавовник, огірок, баклажан, латук, диню, горох, перець, арахіс, картоплю, оранжевий гарбуз, редис, рапс, шпинат, сою, зелений гарбуз, цукровий буряк, соняшник, тютюн, томат і кавун. Необмежувальні приклади стабільно трансформованих рослинних клітин з однодольних рослин за винаходом включають: кукурудзу, цибулю, рис, сорго, пшеницю, жито, сочевицю, цукрову тростину, овес, тритикале, просо і газонну траву.

Для скринінгу трансгенних рослин, що експресують ген стійкості до глуфосинату, їх можна обприскувати використанням у сільському господарстві рівнем гербіциду, глуфосинату амонію (GLA). Сходи T₁ Arabidopsis, одержані з використанням способів за винаходом, показували стійкість до гербіциду при п'яти послідовних застосуваннях використовуваного в сільському господарстві дозування глуфосинату, наприклад через день, починаючи з 7-го дня після проростання. Геномну ДНК із цих трансгенних рослин аналізували на присутність pat і ufr за допомогою ПЛР, і результати показали присутність послідовностей ДНК pat і ufr. Секвенування ПЛР-продуктів в результаті виявило коректні послідовності трансгенів pat і ufr в T₁-рослинах Arabidopsis, одержаних з використанням способів за винаходом.

Трансгенні рослини за винаходом можна регенерувати зі стабільно трансформованих рослинних клітин, одержаних способами за винаходом. Такі рослини можна використовувати або культивувати будь-яким чином, причому присутність молекул, що представляють інтерес, нуклеїнових кислот є бажаною. Відповідно, трансгенні рослини можуть бути генетично модифіковані, inter alia, для того, щоб вони мали одну або декілька бажаних ознак, шляхом трансформування їх молекулами функціоналізованих лінійних нуклеотидних касет за допомогою опосередкованої наночастинками трансформації, і оброблені і культивовані будь-яким способом, відомим досвідченим фахівцям у даній галузі.

Наступні приклади наведені для ілюстрації деяких конкретних ознак і/або варіантів здійснення. Приклади не слід витлумачувати як такі, що обмежують винахід конкретними наведеними ознаками або варіантами здійснення.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1: Одержання наночастинок для трансформації рослинних клітин

Одержання ДНК; плазмідна ДНК

ДНК плазміді pDAB383 (фігура 1) була виділена і підготовлена для трансформації рослини лінійною ДНК, опосередкованою покритими стрептавідином квантовими точками. Ця плазмідна містить ген селектованого маркера, PAT, керований промотором убіквітину 10 з Arabidopsis (AtUbi10), і ген жовтого флуоресцентного білка з Philadium (PhiYFP), керований промотором вірусу мозаїки прожилок маніоки (CsVMV). Експерименти по трансформації досліджували з використанням лінеаризованої ДНК.

Для лінеаризації pDAB3831 виконували ПЛР. Плазмідну pDAB3831 ампліфікували за допомогою ПЛР, використовуючи проточну термоциклічну систему. Міжнародна публікація PCT WO 2008/045288. Приготовляли зразок, що містить: 12 % MgCl₂ (25 мМ), 0,33 % Taq ДНК-полімерази (5 од./мкл), 2,0 % суміші чотирьох дезоксирибонуклеотидів (дезоксіаденозину трифосфату (dATP), дезоксицитидину трифосфату (dCTP), дезоксигуанозину трифосфату (dGTP) і дезокситимідину трифосфату (dTTP)), 8,0 % матриці (мкг/мл), 61,66 % розчину Pluronic F108 (1,5 % розчину), 4 % прямого праймера, 4 % зворотного праймера і 8 % реакційного буфера (10× концентрації). Сполучені сектори системи встановлювали на температуру 95 °C,

59 °C і 72 °C для реакцій дисоціації, відпалювання і подовження, відповідно. ПЛР-суміш прокачували через систему, використовуючи посудину під тиском 20 PSI. Після надходження реакційної суміші в термोकонтрольований відсік, використовували мінеральну олію для проштовхування зразка по всій довжині каналів. Швидкість потоку реакційної суміші підтримували за допомогою регулятора потоку на 0,25 мл/хв. Специфічну ДНК, присутню у зразку, ампліфікували в міру його циклічного проходження через температурні зони. Після тридцятого циклу збирали вміст. ПЛР-продукт очищали на гель-фільтраційній колонці з наступним осадженням етанолом. Зразок очищеного продукту аналізували на Agilent Bioanalyzer™, а також електрофорезом в агарозному гелі, щоб підтвердити розмір і концентрацію ПЛР-продукту.

Матрицею, використовуваною для описаної вище ПЛР, була DAS-плазмідна рDAB3831. Прямий праймер SEQ ID NO:1 і зворотний праймер синтезували для ампліфікації повної експресійної касети 4,6 т.п.о. (тобто лінеаризованої ДНК), що містить обидва гени і їх промотори. На доповнення, для забезпечення кон'югації лінійної дцДНК із поверхнею наночастинок, молекули біотину хімічно приєднували до фосфатної групи праймерів, використовуючи біотин-TEG-CE-фосфорамідит. Даний фосфорамідит має подовжене 15-атомне спейсерне плече зі змішаною полярністю на основі триетилєнґліколевого лінкера. Вигодою подовженого спейсерного плеча, що відділяє функцію біотину від іншого олігонуклеотиду, є зниження будь-яких ефектів стеричних утруднень при зв'язуванні молекули стрептавідину. При міченні прямого праймера біотин знаходиться на початку ДНК. При міченні зворотного праймера біотин знаходиться вкінці фрагмента ДНК. Біотинільований (в обох орієнтаціях) фрагмент ДНК, таким чином, може бути приєднаний до покритих стрептавідином наночастинок. З використанням біотинільованих олігонуклеотидів і проточної термоциклічної системи було одержано приблизно 20 мг лінійного фрагмента ДНК.

Утворення комплексів лінійної ДНК і наночастинок

Покриті стрептавідином квантові точки були одержані від Evident Technology (Troy, NY). 1 мл покритих стрептавідином квантових точок (4 нмоль) інкубували 30 хвилин з 0,5 мг біотинільованої лінеаризованої плазмідної ДНК при кімнатній температурі з утворенням комплексу лінійна ДНК/QD.

Приклад 2: Трансформація бутонів квіток *Arabidopsis*

Рослинний матеріал для трансформації in planta

Синхронне проростання насіння важливе для гарантії однорідності розвитку квіток у рослин *T₀*. Насіння *A. thaliana* екотипу Columbia суспендували в 0,1 % (вага/об'єм) розчині агару і інкубували 48 годин при 4 °C для завершення стратифікації. 60 мг насіння зважували і переносили в 15 мл пробірку. Додавали 13 мл 0,1 % (вага/об'єм) розчину агару і струшували на вортексі до рівномірного розподілу насіння. Це давало концентрацію розчину насіння, що складає 4,6 мг насіння/мл 0,1 % (вага/об'єм) розчину агару (або приблизно 230 насіння/мл). Приготовляли 6 пробірок (72 мл розчину) для посіву на 4 піддони, що містили 18 (3 1/2-дюймових) горщиків в кожному лотку. Розчин насіння інкубували 48 годин при 4 °C для завершення стратифікації. У кожен горщик висівали індивідуально по 1,0 мл стратифікованого розчину насіння. Після посіву на всі горщики, для підтримання вологості ґрунту на лотки поміщали ковпаки для розмноження. Ковпаки забирали через 5 днів після дати посіву. Насіння сходило, і рослини вирощували в Conviron® (моделі CMP4030 і CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canada) в умовах довгого світлового дня (16 годин світла/8 годин темряви) при інтенсивності освітлення 120-150 мкмоль/м²с, при постійній температурі (22 °C) і вологості (40-50 %). Рослини поливали через 10-14 днів після висаджування розчином Хоагlanda і згодом дистильованою водою для підтримання ґрунту вологим, але не мокрим. Через 4 тижні після посіву зрізали квітки, щоб одержати ще більш однорідний ріст вторинних квіток. На 5-му тижні після посіву рослини підготовляли для процесу трансформації.

Трансформація in planta

Трансформацію *A. thaliana* екотипу Columbia лінійною ДНК/квантовими точками виконували, використовуючи модифікований протокол від Clough і Bent. Clough and Bent (1998), Plant J. 16:735-43. 20 мл суспензії з розчином комплексу лінійної ДНК/QD з концентрацією 0,5 мг лінійної ДНК і 4 нМ PQD приготували і використовували для обробки рослин *Arabidopsis* (в основному незрілих суцвіть з декількома заплідненими стручками). Перед зануренням рослин до розчину лінійної ДНК/QD додавали Silwet L-77 до концентрації 0,05 % (об'єм/об'єм) (250 мкл/500 мл) - 0,005 % і добре перемішували. Наземні частини рослини занурювали в розчин лінійної ДНК/PQD на 30 секунд при м'якому погойдуванні. Оброблені рослини поміщали на бік на 30

хвилин у тінь при 22-24 °C. Рослини переносили в Conviron в описані вище умови, залишали рости до зрілості, після чого збирали насіння.

Для скринінгу маси зібраного насіння від рослин T₀ використовували лотки для селекції (лотки 10,5"×21"×1"), приблизно 10000 насінин на кожен лоток. Для гарантії того, що селекційне обприскування було проведене правильно, використовували два контролю: негативний контроль трансформації, Col-0; і Columbia Col-0 дикого типу з внесеним гомозиготним насінням із селектованим маркером PAT (фосфінотрицинацетилтрансферазою) як позитивним контролем трансформації. Для досягнення синхронізації насіння стратифікували в 0,1 % (вага/об'єм) розчині агару протягом 48 годин перед посівом. Щоб забезпечити 10000 насінин на лоток для відбору, 200 мг насіння додавали до 0,1 % (вага/об'єм) розчину агару і струшували на вортексі до рівномірного суспендування насіння. Стратифіковане насіння потім висівали на лотки для відбору, заповнені Sunshine mix LP5, і поливали через піддон розчином Хоагlanda. Для ефективності обприскування для селекції важливо, щоб 40 мл суспендованого насіння були посіяні рівномірно на лоток для селекції. Після посіву на кожен лоток для селекції поміщали куполи для розмноження, і рослини вирощували для проведення селекції. Куполи для розмноження забирали приблизно через 5 днів після посіву.

Приклад 3: Аналіз трансформованих рослин Arabidopsis

Відбір трансформованих рослин

Свіжозібране насіння T₁ залишали сушитися на 7 днів при кімнатній температурі. Насіння T₁ висівали в лотки для пророщення (26,5×51 см), у кожен лоток висівали аліквоту 200 мг стратифікованого насіння T₁ (приблизно 10000 насінин), яке попередньо ресуспендували в 40 мл 0,1 % (вага/об'єм) розчину агарози і залишали на 2 дні при 4 °C для завершення періоду спокою і гарантії одночасного проростання насіння.

Sunshine Mix LP5 покривали дрібнозернистим вермикулітом і поливали через піддон розчином Хоагlanda доти, поки ґрунт не ставав вологим, надлишок води видаляли самопливом. Кожну аліквоту (40 мл) стратифікованого насіння висівали рівномірно на вермикуліт за допомогою піпетки і закривали куполами для зволоження на 4-5 днів. Куполи видаляли за 1 день до першої селекції трансформантів з використанням післясходового обприскування глүфосинатом.

Через сім днів після посадки (DAP) рослини T₁ (сім'ядоля і стадія 2-4 листів, відповідно) обприскували послідовно п'ять разів протягом п'яти днів 0,2 % (вага/об'єм) розчином гербіциду Liberty (200 г кислотних еквівалентів (к.е.)/л глүфосинату, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) у кількості 10 мл розчину для обприскування на лоток (703 л/га), використовуючи наконечник пневматичного обприскувача DeVilbiss для досягнення ефективної концентрації 280 г к.е./га глүфосинату на одну обробку. Через 4-7 днів після останнього обприскування ідентифікували рослини, що вижили (активно зростаючі), і пересаджували їх індивідуально в 3-дюймові горщики, підготовлені з горщиковим середовищем (Metro Mix 360). Пересаджені рослини закривали ковпаками для вологості на 3-4 дні і поміщали в ростову камеру на 22 °C як раніше або переносили відразу в теплицю. Ковпаки згодом забирали, і рослини вирощували в теплиці (при 22±5 °C, 50±30 % відносній вологості, 14 годин світла/10 годин темряви і мінімум 500 мкЕрг/м²с¹ природного + штучного світла).

Молекулярний аналіз і доказ геномної інтеграції трансгенів

Геномну ДНК із трансгенних рослин *A. thaliana* виділяли з листового матеріалу 6-тижневих рослин, використовуючи Plant DNAzol™ (Invitrogen) відповідно до інструкцій виготовлювача. ПЛР-праймери підбирали для детекції трансгенів YFP і PAT. YFP-праймери представлені як SEQ ID NO:3 і SEQ ID NO:4. PAT-праймери представлені як SEQ ID NO:5 і SEQ ID NO:6.

ПЛР-ампліфікація трансгенів на геномній ДНК

ПЛР-ампліфікацію PAT і YFP виконували, використовуючи набір TaKaRa ExTaq™ (Takara, Otsu, Shiga, Japan). Гени ампліфікували в загальному об'ємі реакційної суміші 50 мкл. ПЛР-суміш містила 100 нг геномної ДНК-матриці, 1× реакційний буфер ExTaq, 0,2 мМ суміш dNTP (чотирьох дезоксинуклетидів), 10 пмоль кожного праймера і 0,025 од./мкл ExTaq-полімерази. Використовували наступні умови проведення ПЛР: 1 цикл при 96 °C протягом 5 хв.; і 31 цикл при наступних умовах: 15 сек. при 94 °C, 30 сек. при 65 °C, 1 хв. при 72 °C; і кінцеве подовження протягом 7 хв. при 72 °C. Продукт ПЛР-ампліфікації аналізували електрофорезом у 0,8 % ТАЕ-агарозному гелі і візуалізували забарвленням бромистим етидієм. Фрагменти ДНК очищали з агарозного гелю, використовуючи набір для очищення з гелю QIAEX™ II (Qiagen, Valencia, CA).

ПЛР-фрагменти секвенували, використовуючи прямий праймер для PAT (SEQ ID NO:5) і прямий праймер для YFP (SEQ ID NO:3), з використанням удосконаленої методики секвенування по Сенгеру (MWG Biotech, Huntsville, AL). Дані, одержані в результаті секвенування, аналізували, використовуючи програму Sequencher.

Результати секвенування ПЛР-ампліконів PAT і YFP збігалися з очікуваною нуклеотидною послідовністю для цих генів. Ці результати ясно вказують на те, що послідовності PAT і YFP з рDAB3831 були стабільно інтегровані в геномну ДНК *Arabidopsis* з використанням протоколу трансформації ДНК наночастинками і лінійною ДНК-касетою.

Ці результати вказують на те, що послідовності PAT і YFP були введені в геном за допомогою опосередкованої наночастинками доставки лінеаризованої ДНК у прикладі 1 і, таким чином, забезпечують доказ стабільної інтеграції трансгенів у геномну ДНК рослин *Arabidopsis*.

Приклад 4: Опосередкована наночастинками доставка молекул функціоналізованих лінійних нуклеотидних касет у культивовані рослинні клітини

Одержання матеріалу одиночних рослинних клітин

Використовували як клітини BY2, так і клітини NT1. Клітини BY2 являють собою швидкоростучу лінію клітин рослин тютюну, в яких відсутній зелений пігмент. Клітини NT1 являють собою фотоаутоτροφні клітини, виділені з тютюну. За 3-4 дні до трансформації однотижневу суспензійну культуру пересівали у свіже середовище, переносячи 2 мл культури NT1 або BY2 у 40 мл середовища NT1B або LBY2, що містить 50 нМ DAS-PMT1-1 (інгібітор мікротрубочок) і 0,5-0,1 % (об'єм/об'єм) DMSO у 250-мл колбі. Одиночні клітини збирали або через чотири, або через сім днів після обробки інгібітором мікротрубочок. Використовували одиночні клітини BY2 пропускали через проточний цитометр Бескман для підрахунку живих клітин. Клітини досліджували, використовуючи диференціальний інтерференційно-контрастний (DIC) мікроскоп, з'єднаний з конфокальною системою візуалізації, щоб визначити, що одиночні клітини містять велике число пластид (амілопластів), розподілених по цитоплазмі клітини. Клітини пересівали один раз у 14 днів, переносячи 1 мл суспензії при 3,0 OD₆₀₀. Культивовані клітини використовували як клітини-мішені для трансформації.

Одержання наночастинок і обробка клітин

Для трансформації рослин лінійною ДНК/квантовими точками (QD) виділяли і підготовляли плазмідну ДНК. Плазміда містить ген селектованого маркера, PAT, керований промотором убіквітину 10 з *Arabidopsis* (AtUbi10), і ген жовтого флуоресцентного білка з *Philadium* (PhiYFP), керований промотором вірусу мозаїки прожилок маніоки (CsVMV). Штам *Escherichia coli*, що містить плазмиду, висівали і ростили до помутніння середовища Лурєа-Бертані, що містить ампіцилін, при 37 °С. ДНК виділяли, використовуючи набір Qiagen Plasmid Midi-Prep (Qiagen, Valencia, CA).

Для лінеаризації плазмідної ДНК виконували ПЛР, використовуючи проточну термоциклічну систему. Міжнародна публікація PCT WO 2008/045288. Приготовляли зразок, що містить: 12 % MgCl₂ (25 мМ), 0,33 % Taq ДНК-полімерази (5 од./мкл), 2,0 % суміші dNTP (дезоксіаденозину трифосфату (dATP), дезоксицитидину трифосфату (dCTP), дезоксигуанозину трифосфату (dGTP) і дезокситимідину трифосфату (dTTP)), 8,0 % матриці (мкг/мл), 61,66 % розчину Pluronic F108 (1,5 % розчину), 4 % прямого праймера, 4 % зворотного праймера і 8 % реакційного буфера (10× концентрації). Сполучені сектори системи встановлювали на температуру 95 °С, 59 °С і 72 °С для реакцій дисоціації, відпалювання і подовження, відповідно. ПЛР-суміш прокачували через систему, використовуючи посудину під тиском 20 PSI. Після надходження реакційної суміші в термोकонтрольований відсік, використовували мінеральну олію для проштовхування зразка по всій довжині каналів. Швидкість потоку реакційної суміші підтримували за допомогою регулятора потоку на 0,25 мл/хв. Специфічну ДНК, присутню у зразку, ампліфікували у міру його циклічного проходження через температурні зони. Після тридцятого циклу збирали вміст. ПЛР-продукт очищали на гель-фільтраційній колонці з наступним осадженням етанолом. Зразок очищеного продукту аналізували на Agilent Bioanalyzer™, а також електрофорезом в агарозному гелі, щоб підтвердити розмір і концентрацію ПЛР-продукту.

Прямий і зворотний праймери синтезували для ампліфікації повної експресійної касети (тобто лінеаризованої ДНК), що містить обидва гени і їх промотори. На доповнення, для забезпечення кон'югації лінійної дцДНК із поверхнею наночастинок молекули біотину хімічно приєднували до фосфатної групи праймерів, використовуючи біотин-TEG-CE-фосфорамідит. Біотинільований (в обох орієнтаціях) фрагмент ДНК, таким чином, може бути приєднаний до покритих стрептавідином наночастинок. З використанням біотинільованих олігонуклеотидів і проточної термоциклічної системи лінійний фрагмент ДНК був одержаний у міліграмових кількостях.

Утворення комплексів лінійної ДНК і наночастинок

Покриті стрептавідином квантові точки були одержані від Evident Technology (Тroy, NY). 1 мл покритих стрептавідином квантових точок (4 нмоль) інкубували 30 хвилин з 0,5 мг

біотинільованої лінеаризованої плазмідної ДНК при кімнатній температурі з утворенням комплексу лінійна ДНК/QD.

Наночастинки, кон'юговані з лінійною ДНК, додавали в кількості 1-3 мкл/мл до 500 мкл клітин у 24-ямковому планшеті і м'яко обертати на гойдалці протягом 20 хвилин у темряві. У цей час

5 наночастинки переносяться через клітинну стінку.

Приклад 5: Опосередкована поліфункціоналізованими наночастинками трансформація in planta рослин *Arabidopsis*

Трансформацію in planta рослин *Arabidopsis* можна провести, використовуючи модифікований протокол від Clough і Bent, 1998. Для підвищення ефективності трансформації

10 оптимізували концентрацію ДНК на поліфункціоналізованій наночастинці разом з молекулами направляючих доменів білкової трансдукції (PTD) і NLS-одиниць (одиниць сигналу ядерної локалізації).

Рослинний матеріал: здорові рослини *Arabidopsis* вирощували в умовах довгого світлового дня в горщиках у ґрунті до цвітіння. Перші суцвіття видаляли для посилення проліферації

15 множини вторинних суцвіть. Рослини готові приблизно через 4-6 днів після видалення суцвіть. Рослини *A. thaliana* екотипу Columbia (Col-0) були вибрані як вихідні (рослини T₀) для трансформації in planta квіток. Синхронізоване проростання насіння важливе для гарантії однорідності розвитку квіток у рослин T₀. Насіння рослин дикого типу суспендували в 0,1 % розчині агару і інкубували 48 годин при 4 °C для завершення стратифікації. 60 мг насіння

20 зважували на папері для зважування і переносили в 15 мл пробірку. Додавали 13 мл 0,1 % розчину агару і струшували на вортексі до рівномірного розподілу насіння. Це давало концентрацію розчину насіння, що складає 4,6 мг насінин/мл розчину (або приблизно 230 насінин/мл). Приготовляли 6 пробірок (72 мл розчину) для посіву на 4 піддони, що містили 18 (31/2 дюймових) горщиків в кожному лотку, і висівали в загальному 2 горщики. Розчин

25 інкубували 48 годин при 4 °C для завершення стратифікації. У кожен горщик висівали індивідуально по 1,0 мл стратифікованого розчину насіння на горщик. Після посіву на всі горщики, для підтримання вологості ґрунту на лотки поміщали ковпаки для розмноження. Ковпаки забирали через 5 днів після дати посіву. Насіння сходило, і рослини вирощували в Conviron® (моделі CMP4030 і CMP3244, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canada) в умовах довгого світлового дня (16 годин світла/8 годин темряви) при інтенсивності

30 освітлення 120-150 мкмоль/м²с, при постійній температурі (22 °C) і вологості (40-50 %). Рослини поливали через 10-14 днів після висаджування рослин розчином Хоагlanda і згодом дистильованою водою для підтримання ґрунту вологим, але не мокрим. Через 4 тижні після посіву зрізали квітки, щоб одержати ще більш однорідний ріст вторинних квіток. На 5-му тижні після посіву рослини підготовляли для процесу трансформації.

Одержання нанокон'югатів для обробки квіток: для обробки були вибрані наночастинки з діапазоном розмірів 2-120 нм і поліфункціоналізовані лінійною ДНК-касетою і направляючими

40 пептидами згідно з Derufus et. al. (2007). Були одержані квантові точки з максимумом емісії 655 або 705 нм і модифіковані стрептавідином і аміногрупами. Концентрації QD вимірювали за допомогою оптичного поглинання при 595 нм, використовуючи коефіцієнти екстинкції, надані постачальником. Використовуваними зшивальними агентами були сульфо-LC-SPDP (сульфосукцинімідил-6-(3'-[2-піридилдитіо]-пропіонамідо)гексаноат) (Pierce) і сульфо-SMCC (сульфосукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат) (Sigma).

45 Аміномодифіковані стрептавідин-QD кон'югували з кон'югованими з біотином лінійними ДНК-касетами і направляючими пептидами, використовуючи зшивальні агенти. QD ресуспендували в розчині, що містить 50 мМ фосфат натрію, 150 мМ хлорид натрію, pH 7,2, використовуючи фільтри Amicon Ultra-4 (поріг 100 кДа). До QD додавали зшивальний агент (у 1000-кратному надлишку) і залишали для проходження реакції на 1 годину. Зразки фільтрували самопливом на колонку NAP-5 (для видалення надлишку зшивального агента) в аналогічному буфері з

50 доданою 10 мМ EDTA. Пептиди звичайно використовували з ліофілізованого порошку. Пептиди і лінійні ДНК-касети додавали до фільтрованих QD і залишали для проходження реакції на ніч при 4 °C. З використанням трьох фільтрів Amicon продукт двічі фільтрували з фосфатносолевим буфером по Дюльбекко (PBS), двічі з високосолевим буфером (1,0М хлорид натрію, 100 мМ цитрат натрію, pH 7,2) і знову двічі з PBS. Промивання високою сіллю

55 вимагаються для видалення електростатично зв'язаних молекул ДНК і пептидів, що не видаляються тільки промиваннями PBS. Сульфо-SMCC має N-гідроксисукцинімідний (NHS) складний ефір на одному кінці, що вступає в реакцію з аміномодифікованими QD з утворенням амідного зв'язку. Сульфо-SPDP також містить N-гідроксисукцинімідний (NHS) складний ефір, що вступає у реакцію з аміногрупами, який швидко вступає в реакцію з будь-якою молекулою, що

60 містить первинний амін, таким чином утворюючи стабільний амідний зв'язок.

Трансформація in planta і скринінг стійких рослин T₁: приготувляли кінцевий об'єм 250-500 мл суспензії з розчину кон'югата наночастинок, направляючого пептиду і лінійної ДНК-касети, і потім рослини *Arabidopsis* (в основному незрілі суцвіття з декількома заплідненими стручками) використовували для обробки. Перед зануренням рослин до розчину NHPD-кон'югата додавали Silwet L-77 до концентрації 0,05 % (250 мкл/500 мл) - 0,005 % і добре перемішували. Наземні частини рослини занурювали в розчин NHPD-кон'югата на 2-30 секунд при м'якому погойдуванні. Оброблені рослини поміщали під ковпак або закривали на 16-24 години при 22-24 °C. Рослини переносили в Conviron і залишали рости до зрілості, після чого збирали насіння. Для скринінгу маси зібраного насіння від рослин T₀ використовували лотки для селекції (лотки 10,5"×21"×1") і приблизно 10000 насінин на кожен лоток. Для гарантії того, що селекційне обприскування було проведене правильно, використовували два контролю: негативний контроль трансформації, Col-0; і Columbia Col-0 дикого типу з внесеним гомозиготним насінням із селектованим маркером PAT (фосфінотрицинацетилтрансферазою) як позитивним контролем трансформації. Для досягнення синхронізації насіння стратифікували в 0,1 % (вага/об'єм) розчині агару протягом 48 годин перед посівом. Щоб забезпечити 10000 насінин на лоток для відбору, 200 мг насіння додавали до 0,1 % розчину агару і струшували на вортексі до рівномірного суспендування насіння. Стратифіковане насіння потім висівали на лотки для відбору, заповнені Sunshine mix LP5, і поливали через піддон розчином Хоагlanda. Для ефективності обприскування для селекції важливо, щоб 40 мл суспендованого насіння були посіяні рівномірно на лоток для селекції. Після посіву на кожен лоток для селекції поміщали куполи для розмноження, і рослини вирощували для проведення селекції, використовуючи умови, зазначені раніше. Куполи для розмноження забирали приблизно через 5 днів після посіву. Сходи обприскували через п'ять днів після посіву і повторно через 10 днів після посіву, використовуючи 0,2 % (об'єм/об'єм) розчин (20 мкл/10 мл дистильованої води) глуфосинату амонію (гербіцид LIBERTY® від Bayer CropSciences) у кількості 10 мл розчину для обприскування на лоток (703 л/га) і наконечник пневматичного обприскувача DeVilbiss для досягнення ефективної концентрації 280 г/га глуфосинату на одну обробку. Кількість приготавлюваного гербіциду Liberty® обчислювали наступним чином: $(703 \text{ л/га об'єму обприскування} = 280 \text{ GPA}) \cdot (280 \text{ г активного інгредієнта (a.i.) / га}) \times (1 \text{ га} / 703 \text{ л}) \times (1 \text{ л} / 200 \text{ г a.i. глуфосинату}) = 0,20 \%$ розчин (або 20 мкл/10 мл). 10 мл розчину переносили за допомогою піпетки в 20 мл сцинтиляційну пробірку для кожного обприскуваного лотка. Обприскування проводили горизонтально і вертикально. Через 4-7 днів після другого обприскування ідентифікували стійкі до гербіциду рослини.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб введення молекули функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, у клітину рослини, що має клітинну стінку, причому спосіб включає в себе: надання рослинної клітини, що має клітинну стінку;
- 40 покривання наночастинок на основі квантової точки молекулою функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, де наночастинка на основі квантової точки містить функціональну групу, яка взаємодіє з молекулою функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес;
- здійснення контакту між рослинною клітиною, що має клітинну стінку, і покритою наночастиною на основі квантової точки; і
- 45 забезпечення можливості поглинання наночастинок на основі квантової точки і молекули функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, рослинною клітиною, що містить клітинну стінку.
2. Спосіб за п. 1, у якому наночастиною на основі квантової точки є кон'югована наночастинка стрептавідин-QD.
- 50 3. Спосіб за п. 1, який додатково включає в себе забезпечення можливості поглинання наночастинок на основі квантової точки компартментом рослинної клітини, що містить клітинну стінку.
4. Спосіб за п. 3, який додатково включає в себе покривання наночастинок на основі квантової точки білком, що направляє в субклітинний компартмент.
- 55 5. Спосіб за п. 4, у якому компартмент вибраний із групи, що складається з цитозолу, ядра, тонопластів, пластиди, етіопласта, хромопласта, лейкопласта, елайопласта, протеопласта, амілопласта, хлоропласта і просвіту подвійної мембрани.
6. Спосіб за п. 1, у якому рослинною клітиною, що має клітинну стінку, є рослинна клітина з видів комерційних сільськогосподарських рослин.
- 60

7. Спосіб за п. 6, у якому рослинна клітина вибрана з групи, що складається з клітин тютюну, моркви, кукурудзи, каноли, рапсу, бавовнику, пальми, арахісу, сої, *Oryza sp.*, *Arabidopsis sp.*, *Ricinus sp.* і цукрової тростини.
- 5 8. Спосіб за п. 6, у якому рослинна клітина належить до тканини, вибраної з групи, що складається з зародка, меристеми, калюсу, пилку, листів, пиляків, коренів, кінчиків коренів, квіток, насіння, стручків і стебел.
9. Спосіб за п. 1, у якому рослинною клітиною, що має клітинну стінку, є культивована клітина.
10. Спосіб за п. 1, у якому наночастинкою на основі квантової точки є напівпровідникова наночастинка.
- 10 11. Спосіб за п. 1, який додатково включає в себе модифікацію поверхні наночастинки на основі квантової точки.
12. Спосіб за п. 1, у якому молекула функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, містить нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, що складається з молекул ДНК, РНК, РНКі і генів.
- 15 13. Спосіб за п. 12, у якому молекула функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, містить ген.
14. Спосіб за п. 13, у якому геном є ген чужорідного білка, агротехнічний ген або маркерний ген.
15. Спосіб за п. 1, у якому молекула функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, одержана за допомогою ПЛР-ампліфікації нуклеотидної послідовності.
- 20 16. Спосіб за п. 15, у якому нуклеотидна послідовність одержана з молекули нуклеїнової кислоти, вибраної з групи, що складається з плазмід, космід, штучних хромосом, дріжджових штучних хромосом і бактеріальних штучних хромосом.
17. Спосіб за п. 12, який додатково включає в себе відбір клітин, що мають стабільно інтегровану молекулу функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес.
- 25 18. Спосіб за п. 17, у якому вибрані клітини є регенерованими клітинами.
19. Спосіб за п. 18, який додатково включає в себе регенерацію рослини з регенерованих клітин.
20. Спосіб введення молекули функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, у рослинний матеріал, причому спосіб включає в себе:
- 30 надання рослинного матеріалу, причому рослинний матеріал вибраний із групи, що складається з рослинних клітин, рослинних тканин і рослин;
- надання наночастинки на основі квантової точки;
- покривання наночастинки на основі квантової точки молекулою функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес;
- 35 забезпечення контакту між клітиною, що має клітинну стінку, і покритою наночастинкою на основі квантової точки; і
- забезпечення можливості поглинання наночастинки на основі квантової точки і молекули функціоналізованої лінійної нуклеотидної касети, що представляє інтерес, рослинним матеріалом.
- 40 21. Спосіб за п. 20, у якому рослинний матеріал є рослинною тканиною, вибраною з групи, що складається з зародка, меристемної тканини, калюсу, пилку, листів, пиляків, коренів, кінчиків коренів, квіток, насіння, стручків і стебел.

SEQUENCE LISTING

<110> Dow Agrosciences LLC

Yau, Kerm Y.
Samuel, Jayakumar P
Burroughs, Frank G.
Samboju, Narasimha C.
Webb, Steven R.

5

<120> PRODUCTION OF FUNCTIONALIZED LINEAR DNA CASSETTE
10 AND QUANTUM DOT/NANOPARTICLE MEDIATED DELIVERY IN PLANTS

<130> 2971 10045.1PC (68330-WO-PCT)

<150> 61/362,222

15

<151> 2010-07-07

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

20

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25

<220>

<223> Forward primer for plasmid pDAB3831

<400> 1

30

tgaaagtga catcaacga

20

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

35

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for plasmid pDAB3831

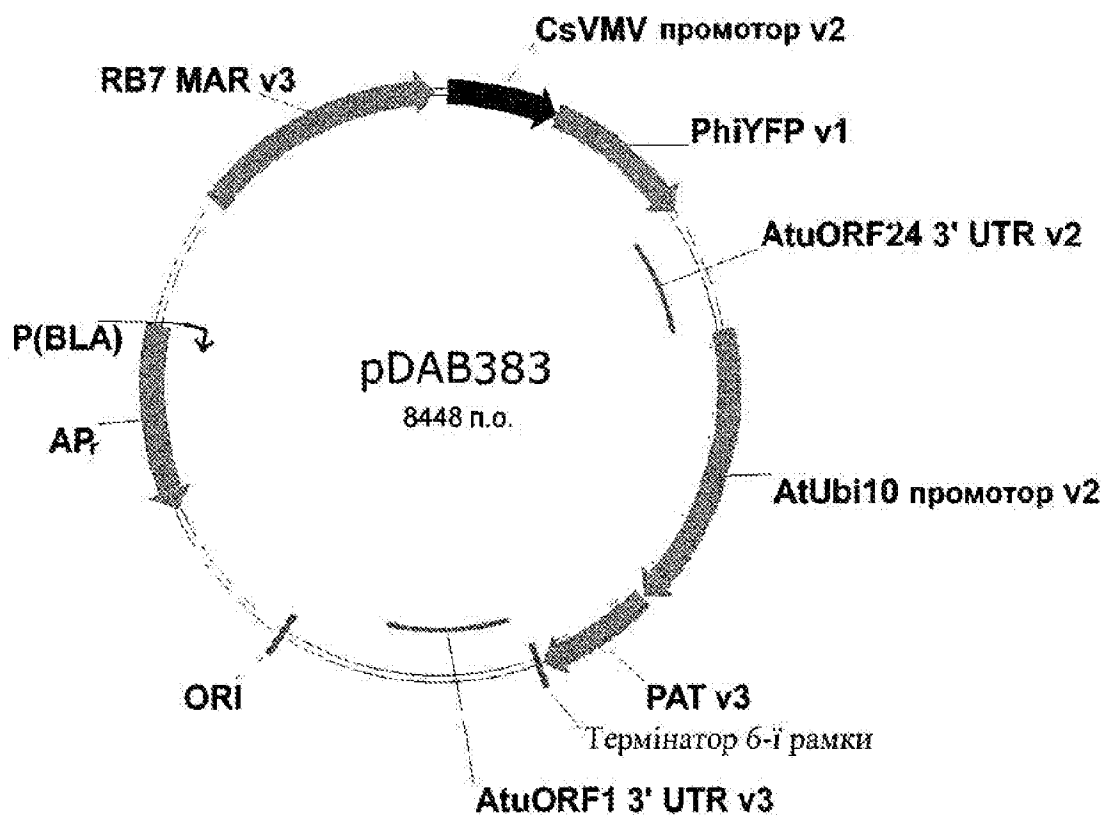
40

<400> 2

cggcaactat ttaaacac

18

	<210> 3	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
5	<220>	
	<223> Forward primer for YFP gene	
	<400> 3	
10	tggtccacgg caagatcccc taag	24
	<210> 4	
	<211> 24	
	<212> DNA	
15	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Reverse primer for YFP gene	
	<400> 4	
20	tattcatctg ggtgtgatcg gcca	24
	<210> 5	
	<211> 24	
25	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Forward primer for PAT gene	
30	<400> 5	
	ggagaggaga ccagttgaga ttag	24
	<210> 6	
35	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
40	<223> Reverse primer for PAT gene	
	<400> 6	
	agatctgggt aactggccta actg	24



Фиг. 1

```

1  GGCGGCTAAA  CCGAGAGGAT  AATTATCCAA  GATGTAGGAT  CAGGAATCCA  ATGTTTACGG  GAAAACTAT  GGAAGTATTA  TGTAAAGTCA  GCAAGAGACA
101  GATCAATATG  CGGACATATG  GCAACCTATG  TTCAAAAATG  AAGAATGTAG  AGATACAAGA  TCTATATCTG  CCAGAAATAG  AAGAGAATA  GGTAGAAAT
201  GAAAAAGAGG  AACAGGCGCA  AGAAAAGGAT  CTGAGAGAGG  TAAGTACATG  CACACAGCAT  GAAAAAGAGA  AGATAAGGTC  GGTATTTGTC  AAGAGAGCAC
301  AGAGGACACA  TGTAAAGTGG  AAAATGTAGG  GCGGGAAGCT  AACCTTATCA  CAAAGGAAATC  TTTATCCGCA  CTACTTATCC  TTTATATTTT  TTCCGTATCA
401  TTTTGGGCTT  TGACTTTTCC  TMTATAGGCA  ACCAAGTTCC  CATTTTTCTA  AATCAAGAAA  AATTATGCTG  TAAGCTATTT  TCTTGAAGTT  ACAGAGGATA
501  CAACTTACAA  GAAATTTGTA  AGTTTGTAGA  TCTCCATGGG  CTCAGGCGCG  GCGGTGCTGT  TCCACGGCAA  GATCCCTTAC  GGTGAGGAGA  TGAAGGCAA
601  TTGGGATGGC  CACACCTTCA  GCATCGCGCG  CAGGCGCTAC  GCGATATCCA  GCGTGGGCGA  GGTGGATGCC  GAGTTTCTCT  GCACACCGCG  GATATGCGCC
701  GTCCCTCTGA  GCACCGTGGT  GACCAACCTG  AGCTACGCGG  CCGAGTCTTT  GCGCAAGTAC  GGCCCGAGGC  TGAAGAGATT  CTACAGAGGC  TGCATGCGCG
801  ATGGCTACGT  GAAGGAGCGG  ACCATCACTT  TTAGAGGCGA  TGGCAATTCG  AAGACCGCGG  GCGAGGTGAC  CTTCAGAGAT  GCGAGCTGTT  ACAATGCGGT
901  GAAGCTGAT  GCGAGGCGCT  TCAGAGAGGA  TGGCGAGGTC  CCGGGCAGGA  ATCTGAGTTT  CAAATTTCAAC  CCGCAGCTGC  TATACATCTG  GCGAGATCAG
1001  GCAATCAAG  GCGTGAAGAG  CGCCTTCAG  ATCTGCCAG  AGATCACCGG  CAGCAAGGCG  GATTTCATCG  TGGCGATCA  CAGCGAGATG  AATACCGCA
1101  TGGCGGCGG  CCGCGTGCAC  GTGCGGAGT  ACCAGCACT  GAGCTACCGC  GTGAAGCTGA  GCAAGGATGT  GAGCGATCAC  GCGGATATTA  TGAAGCTGAA

```

NotI

AvrI

ApaLI AseI

Fig. 2

```

3  GCGCGCTAAA CCGAGAGGGT AATTATCCAA GATGTAGCAT CAGGAATCCA ATGTTTACGG GAATAACTAT GGAGGTATTA TGTAGGCTCA GCAAGAACCA
   CCGGCGATTT GCGTCTTCCA TTAATAGGTT CTACATCGTA GTTCTTACGT TACAAAGGCG CTATTGTATA CCTTCAGAAAT ACATTGGAGT CGTTCTTCCT
101 GATCAATATG CGGCACATAT GCAACCCATG TTGAAAATG AAGAATGTAC AGATACAAGA TCCATATCTG CCGAGAAACG AGCAAGAAAT GGTACAAATT
   CTAGTCTACAC GCGGTGTATA GCTTAGATAC AAGTTTCTAC TTCTTACATG TGTATGTTCT AGATATATAC GATCTTATGC TTCTCTCTAT GCTCTTTTAA
201 GAAAAGAGAG AACCGGGCTA AGAAAAGAAI CTGAGAGACG TAAGGCTGTA GACCAACAAI GAAAAGAGAG ACATAGGGTC GGTGATTGTC AAGAGAGAT
   CTTTCTCTTC TGTGTGGCT TCTTTCTTCA GAATCTCTGC ATTCTGAGCT GCGTGTGTA CTATTCTTCT TGTATTCGAC CCACATAACG TTCTCTGTAT
301 AGAGGACACG TGTAGGTGCG AAAATGTAGG GCGGAAAGAT AGCTTATCA CAAAGGAAAT TTTATCCACA CTACTTATGC TTTTATATTT TTGGTGTCTA
   TCTCTCTGAT ACATTTCACG TTTTACATTC CCGGCTTCA TTGGAATATG GTTCTCTAG AATAGGGGTT GATGAATAGG AAAATATATA AAGGCAAGAT
401 TTTTGGGCTT TTAATTTTTC TATATAAGGA ACCAAGTTGC GATTTGTGTA AAACAGAGAA AAATTTGGTG TAAAGTATTT TTTTGAAGT ACCGAGGATA
   AAAACGCGGA ACTTAAAGG ATATATTCCT TGGTTLAAGC CGTAACACCT TTGTTCTCTT TTTAAACCAAC ATCGATATAA AGAAACTTCA TBACTCTTAT
                                     NotI
501 CAACCTCAGG CAATTTTCTA AGTTTGTAGA TCTCATGGG CTCGAGCGGG GCGGTGCTGT TCCACGGCAA GATCCCTAC GTTGTGGAGC TCGAGGCGAA
   GTTGAAGTCT CTTTAAACAT TCACACATCT AGAGGTACCG GAGGTGCGCG CGGAGCAGAC AGTTGCGGTT CTAGGGGATG GACCACTCTC ACCTGCGGTT
601 TGTGGATGGC CAATCCTTCA GATCTCGCG CAAAGGCTAC GCGGATGCGG GCTGTGCGCA GTTGGATGCG CAGTTCATTT GCACCACTGG GATGTGTCCC
   ACACCTACCG GTGTGAAAT GTTAGGCGCG GTTCCGATG CCGCTACGCT CCGACCGGTT CCACCTACGG GTTAAGTAGA CTTGTTGGCC GCTACACGG
                                     ApaI
701 GTGGCCGCGA GCGCCCTGCT GACCAACCGT ACTACGCGG CCGAGTCTCT GCGGATAC GCGCCCGAGC TGAAGCATTT CTACAGAGGC TCGATGCGTG
   CACGGACCTT CCGGCGACCA CTGCTGCTAC TCGATGCGCG GGTTCAGGAA GCGGTTCATG CCGGCGCTCG ACTTCTTAAA GATGTGTCTG ACGTACGCGC
801 ATGGCTAAGT CAGGAGGCGC ACCATCAGCT TCGAGGCGTA TGGCAATTC AAGACCGCGG CCGAGGTGAC CTTCGAGAAI GCGACCTGTG ACAATCGGCT
   TACGGATGCA CTTCTCGCG GTGTAGGAGA AGCTCGCGCT ACCGTAAAG TCTGTGGCGG GCGTGCATCG GAAGCTCTTA CTTTGCAGCA TGTTAGCGCA
901 GAACTGAAAT GCGCAAGGCT TCGAGAGGGA TCGTCACTG CTGGCAAGA ATCTGCAATT CAATTTCACC CCGCACTGCC TGTATCTGTC GCGCATCAGI
   CTTCGATTTA CGGTCTCGCA AGTTCTTCTT ACCGTTGAC GACCTCTTCT TAAAGCTCAA GTTAAAGTGG GGGGTGAGCG ACATGTAGAC CCGCTTATCT
1001 GCGATTCAGG GCGTGAAGAG CGGCTTCAGG ATCTGCGAGG AGATCACCGG CAGGAGGCGC GATTTCTATG TGGCGGATCA CACCTAGATG AATATCGGCA
   CGCTTAGTGC CGGACTTCTC GCGGAAGTTC TAGACGTTGC TGTAGTGGCG CTGCTTCCCG CTAAAGTAGC ACCGCTTATG GTGGTCTAC TTTTGGGGT
                                     ApaLI       AfaI
1101 TCGGCGCGCG CCGCTGCTAC GTGCGCGGAT ACCACACAT GAGCTACAC GTTAAAGTGA GCAAGGATGT GACCGATCAC GCGATATATA TGAAGCTGAA
   AGCTGCGCTC GCGGCGAGTG CAGGCGCTCA TGTGGGTTA CTGATGCTG CACTTCGAT CTGTCTTACA CTGGCTAGCG GCGCTATAT ATCGGATCT

```

Фіг. 2
продовження

1301 GAGACCGTGG GCGGCGCTGG ATTGCGCGAA GACCGACCTG TCGACAGCTG GATCGCGCA CCGAACCTTG GACTCGGATG TCGCGAAGG GAGCGAACA
CCTCTGGGAC GCGCGCGACC TAACGCGCTT CTGGCTGGAC ACTCTCGAGC GTACGCGAGT GGTTCGGAAC CTGCGGTCAC AACGCTTCOC GTTGGTTTGT

1391 AACATTAAT GATCGCTCC TGCATATGG GCGCTTGAG TATTTCAGT GGCATTGAG CTGAATTGAA GACTTCCTCC TGTGGAAT TCGCTGAGCT
TTGTTACTTA CAGCGCGAG AGCTATACCC GCGCAACCTC AAGAGTTGA CCGTAACCC GACTTCAGTT CTGTACGAGC AGCTCTTA AGGACTAGC

1491 TATCGATAT TATGTAATCT GCGCGCAATC CCGTAATGTC GCGCTTTA TGTCTCTTG TATCTCTTA TCGATCTG TACGCTTGC TTCTCATATG
ATGAGTTATA AGCTATTAGA GCGGTTTATA GCGTTTATAC GCGCGAAT AGACGAAAC ATACCAAGT ATGTAAGTAC ATGCGAATG AAGAGTATAC

1591 AATTTGAAA TAAATATCG GATATAGTCT AGCAATATTT GGTATCGGAG ATCTTCGAA TCGCAATGAT GCGTACGAGC GCGAGAAAT AATTAAGCT
TTAAAGTTT ATTAATAGC GCTATCTGA TCGTTATAAA GCGTAGGAGC TACAGAGTT AGTGTCTCA GCGTACGAGC GCGCTTTAT TAACTGCGC

ClaI

1691 CTTTAAATCC AATCTTAAA TAAATGAGGC AATTAAGAT TTTTGTGAT TTTAAGATA GCGAGTCGAT TGTCCAGCAA GCGTCAAGCA AATTAATGT
GGAATATAG TTAGATTTT ATTAAGTCCG TTTATTTTAA AAAAACTA AATAATGAT CCGTACGAGC AGAGCTCTT GCGAGCTCTT TTTATACAC

AvaI

1701 TATTCTAAA TAAATTTGA TATTAAATC GCGAGAGGC AATATGCTT TTAACAAAC ATGAAATTTAG TACTTTAATA AATATATGC TCGCGCGGCG
ATAAGATTT ATGAAAACT ATTAATTTAG GCGCTTTCCG TTTTACGTA AATGCTTTG TCAATTAATC ATGAAATTTT TTTTATAGC AGCGGCTCG

PstI

1801 GCGGCGCTT AATTAATTT AATGTTTAA ACCCGGCTG CAGCTTAAAG GATCAGGATA TCTCTTTTA AGATGTTGAA CCGTATGAGC GTTGTATGA
GCGCGCGAA TTAATTTAA TTACCAATTT TCGCGCGGAC TCGCGTTCG CTACTCTAT AAGACAAAT TCTACAGCT GAGTATCTT CAAACATCT

1901 ACTGTGATC TAGGACGGA TAAATTCCT TCTCTATGC GACCTATTC AAGAAATTT TGTGTATCA TCTCTTAC ATTTTATTA ATGAAAAAT
TGACTACTAG ATCTGCGCT ATTCAAGGA AGAGTATCG CTGAAATAG TTTCTTACA AACACAGAT AGAGCAATG TACGATAT TACTTTTTA

2001 ATTATGCTT ATTGACGTA ACACAGGCT TAAATATGA CAGCGCGCA AATAGATCC ATTGATAT TAAATATA ACAGATAT ATCGATCTC
TAATACGAG TACCTGACT TGTCTTACA ATTTATGCT GCGCGCGGCT TTATCTTAG TAACTATCA CTATATTT TTTCTTAT TACTCTGAG

2101 CAAACGCTT GCGCTTTTA ACAGAGCTG TCGAGCAAT TCAACAAAA CTCTATATC TACCAATTC AATATATCA AATTAATC CAATTAACCT
GTTTCTGAA GCGAAAAAT TGTCTTAAAC AAGGCTTGA ACTATTTT CAGTAATAG ATAGCTTAG TTATATGAT GTTTTATAG GTTATCTGA

2201 AAAAATTA AAGAAATGA TAACTTACA ATATTTATA CCGTAAGAA GTTACTTTT CAGAAATTC ACTGATTTA TAAAGCAAT TCGCTTATG
TTTATTAAT TCTTTTACT ATTAATTTG TATACATAT GGTATTTCT CAGTAAGAG GTTCTTTAG TACTAATAT ATTGCGTGA AGTAAATCT

Fig. 2
продовження

3801 CTGAGCTCTA TCGAGCGCA AGCTTTAAG TCTCTGCTG CTGTTATAG CTTCCAAAC GATCGATTTG TTAGGTTGCA TTAGGCTTTG GATATACAG
GATATAGAT ACCCGGCTT TCGAAAACT ACACAGCAAC GAGATATCC GAGAGCTTG CTAGATAGAC AATCCAGCT ACTCGGAGAC GCGATCTCT

SmaI
XbaI
AvaI

3901 CCGCGGCTAC ATTGCGGCA GCTGATACA AGCATGCTG ATCGCTGAT GTTCTTTT GCGAAAGCA TTCTGATTC CAGCTCTCT CAGCGGCTT
GCGCGGCTG TACGCGGCT GAGCTTATCT TGTATCTCT TACCTACTA CAGCAAAAA CCGTTCTCTT AAGCTCTAC GGTGAGGAG GTTCTGCTC

BamHI

3901 TCGGCGCTT ACCGAGATCT GAGTACGCT GAGCTTGAGC TTATGAGCT ATGAGCTTAG AGCTCGGATC CACTAGTAA CCGCGGCTC GTGCTGAGC
ATCGGCTCA TCGCTTACA CTCCATGCTA CTGAGCTCT ATATCTGAA TATCTGATC TCGAGCTTAG ATGATCTAT CCGCGGCTC CAGCGCTTA

SmaI
XbaI
AvaI

3901 TCGGCTTCA CTATATGAG GCGGAGTGC GCGGATAG CTCTTTAGG CAGCTCGGCT TCGAGCTAT CTCTTTGAA ATAGTTGCG TCGGCGGCT
AGCGGAGCT GATCTATCG GCGGCTTAG GCGGCTTAT GAGAGATCG GAGAGGCTC AGCTAGGATA GAGCAACTT TATCAAGCTT ACCGCTTCC

4001 TCTCTTCTG AAGAGAGGC GCGCAAGGA ACCGAGCTG AGCTGCGCTA TCGCTCTGC TCTCTTCTG AAGCGCTTG TCTAGCTGC AGAGCTGTA
AGAGAAATC GTTCTCTCC CCGCTTCTT TCGCTCTGC TCCACCGGAT ACCGAGAGTC AAGGAGACCC CTGCGGAGAC AGATTCGAGC TCTGCAAT

4091 GCGGATGAA GCGAAAGTCT GCGATTTGA CAGATATCT TGAATCTAG TACGATAT TAAATATTA TTTCTATCT ATATATCTG TGTATTTCA
GCGCTTACT CTCTTCTCA GCTTAAAT CTCTATACA ACTAGGATC ATCTATTA TTTCTATCT AAGTATGAT TATATATCT ACATAGCTT

4101 TATGATGAT GATTTGAT GTCTTATCT TCGCTTAT TATGAGCTT CAGAAATTA TCGCGGCTG CTCTCTTTA ATCGAGTAT AATATATG
ATAGTATG CTAAAGTTA CAGAAATTA AGCGGCTAC GTTCTTAT ATGAGGCTG GTTCTTAT AAGGCTGCT GAGAGAAAT TATGCTCTT TTTATATG

4201 TTAATATAT TTTGCTAT TCGCTCTTA TCGGATGTA AGCTTCTCT GCGGCGGCT CAGCTCTAT TCAATATCT ACATGATTT GAGAAATTA
ATAATATTA AAGGCTTA ACTAGGCTT ATCTTATCT TCAAGGAGC GCGAGGCTG GTAGGCTTA AGTATTAAT TGTATTAAT CTTTATATTT

4301 AATTTATCT ATTCAATTA AATAGGATCT CTGTAAGTA ATGATATCT GAGAGAAAT TATTTTAT ATTTATGAT AATATTAAT GCGAGGCTT
TTAAATGTA TATTTAAT TTGTCATAT GAGATCTCT TATATAGAA CTCTCTTAT ATCAATTTA TAAATATTA TTTTATGTT GAGTCTTAA

4401 ATAGCTGAG CAGAAATTA AATTTATGA TCGAGGCTT AATGAGGTA TATTTATTA ACTGATTTA CAGCTGCTA CATTGCTGA GATTAAGAG
TATGAGCTT GTTTTGTAT TTAATATCT AGCTTAAAT TTAAGCTCT AATAGGCTT TCAATATAT AGTCTGCTT GAGCGGCTT CACTCTCTG

Fig. 2
продовження

```

4591  TTAGTCCGAT ATTATCTGT AATACATAGC GGGGGGGTTC CTATCCACCC GTGTAGGCTG GCTTAATCAT GGTATAGCT GTTCCTCTTG TAAATTGTT
ACTACGGCTA TATTACCACA TTATTTATCG GGGGGCCAAA GATCAGTGGC CACATCGAAC GGCATTAGTA CAGTATCGA CAAAGGACAG ACTTTACAA
4601  ATCCGCTCAC AATTCCACAC AACATACGAG CGGGAAGCAT AAATCTGTAA GCTTGGGCTG CCTATGAGT GAGCTAACTC ACATTAAATG CATTGCGCTC
TAGGGGAGTG TTAAGGTTTG TTGTATGCTC GGCCTTCTCA TTTCACATTC CGGACCCGAC GGAATTACTA CTGATGAGG TGTAAATTAAC GCAACGGCAG
4701  ACTGCGCGCT TTCCAGTCTG GAAACCTGTC GTCCGAGCTG CATTAAATGA TGGGCCAAGC GCGGGCGGAA GCGGTTTTCG GTATTGCGCG CTTCTGCGCT
TGAAGGGGCA AAGATCGACT CTTTGGACAG CAGGTTCTGA GTAAATTAATT AGCGGTTTTC GCGGCTTCTC GCGGCAAGC CATATCCGCG GAGAGGCTG
4801  GCGCACCGCT GGCACGGCTG GCACTCTGTC TCGCTTACTG ACTGCTGCGC CTGCTGCTGT GCGCTGCGGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCTGTAA
CGCTGCGGAC GCGTGGGAGC CTTGCGGAGG AGCGAGTGAC TGAAGGAGCG GAGCGAGGAA GCGGACGCTG CTGCGCATAG TCGATGAGT TTGCGCATT
4901  TACGGTTATC CACAGAAATC GGGGATAGCG CAGGAAAGAA CATCTGAGCA AAGGCGGAGC AAAAGGCGCG GAGCGGTAA AAGGCGCGCT TCTGCGGCTT
ATGCGAATAG GTGTCCTAGT CCGCTATGTC GTCTTTCTTT GTACACTGCT TTCTGCTGTC TTCTGCGGTC CTGGCGATTT TCGCGGTGCA AGGACCGCAA
5001  TTTCCTATAG CTTCGCGGCT CTGACGAGCA TCACAAAAAT GCACTCTCAA GTCAAGGCTG GCGAAACCGG ACAGGACTAT AAAGATACCA GCGCTTCTCC
AAGGTATCC GAGGCGGGG GACTGCTGCT AGTCTTTTAA GCTGCGATTC GAGTCTGCG GCTTTTGGG TGTCTGATTA TTCTATATTC CCGCAAGGCG
5101  CTTGGAAGCT GCGCTCTGCG GTCTCTGCTT CCGACCTGTC GCTTTACTCG ATACCTCTTC GCGTTTCTTC CTTCGGGAAG CTTGCGGCTT TCTCATAGCT
GGACTCTGCA GCGAGCAGTC GAGAGGACAA GCGTGGGAGC GCGATGCGCT TATGACAGG GCGAAGAGGG GAGCGCTTC GCACTCGGAA AGATATATCG
5201  CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG TCTTCTGCTC CAAGCTGGGC TCGGCGCAGC AACCGCCCTT TCAGCGGAC GCGTGGGCTT TATCGGTAA
GTGCGACATC CATAGATCA AGCCACATCC AGCAGCGGAG CTTCGACCGG ACACAGCTTC TTGCGCGCA AGTGGGCTG GCGACGCGGA ATAGGCGATT
5301  CTATGCTCTT GAGTCCAGCC CGGTAGACA GCACTTATCG CCACTGGCGG CAGCGACTCG TACGAGGATT AGCGAGGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA
GATAGGAGAA CTCAGCTTGG GCGATCTCTT GCTAAATAGC GGTACCGCTC GTGCGGAGC ATTCTCTTAA TCGTCTGCTT CCAACAGTCC GCGACGATCT
5401  GAGTCTTCAA ACTGCGGCGC TAACTACGCG TACACTAGAA GGAAGCTATT TGTCTCTGCG GCGCTGCTGA AGCGAGTAC CTTCGGGAAA AGATCTGCTA
CTCAGAGACT TCAGCACCGG ATTGATGCGG ATGTGATCTT GCTCTCTTAA ACCATAGAGC GAGAGGACT TCGCTCAATG GAGCGCTTTT TCTCAACCAT
5501  GCTCTGTATC GCGCAACAA ACCACCGCTG GTAGCGGCTG TTTTCTCTTT TCGAGCGAGC AGATTAGCG CAGAAAAAAA GATCTCTTAA AGATCTCTTT
TGAGAACTAG GCGCTTTCTT TGGTGGCGAC CATGCGCACG AAAAAACAA ACGTCTGCTG TCTAATGCGC GTCCTTTTCT CTAGAGTTC TTCTAGGAAA
5601  GATCTCTCTT ACGGGCTCTG ACCTCTAGTC GAACGAAAC TCAGCTTAAG GATTTCTCTT CMTGAGATTA TCGAAAAGAT TCTTCACTCA GATCTCTTAA
CTAGAAAAAG TCGCGGAGAC TCGGACTCAC CTGCTCTTTC AGTCAATTC CTGAAAACCA GTACTCTAAT AGTTTTCTCT AGAAGTGGAT CTAGAAAAAT
5701  AATGAAAAAT GAGTCTTTTA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCATGCT TAATCAATGA GGCACCTATC TCAGGATCTT
TTAATTTTTA CTTCAAAAAT TATTTAGATT TCATATATAC TCATTTGAAAC CAGACTCTCA ATGTTTAACT ATTAGTCACT CCGTGGATAG AGTGGCTAGA

```

Fig. 2
продовження

```

5801 GTTATTTCG TTCAATCATA GTTGCCTTAC TCCCGCTCTT GTAGATAACT AGGATACGGG AAGGCTTACC ATCTGGCCCG AGTGTCTGAA TGATACCGCG
CAGATAAAGC AATFAGGTAT CAACTKACTG AAGGGCAGCA CATCTATTGA TGCTATGCCC TCCCGAATGG TAGACCGGGG TCAGCACTTT ACTATGCGCG

5901 AGAAGCGGCT TACCGGCTTC CAGATTATC AGCATTAAC CAGCGAGCGG GAGGGGCGGA GCGGAGAGT GTTCTCTGAA GTTATTCGCG CTGCTCTCAG
CTTGGCTTGG AGTGGCGGAG GTTAAATAG TCTTTATTTG GTCGGTCTGG CTTCGCGCTT CCGTCTTGA CCGGACCTT CAAATAGGCG GAGGTAGGTC

6001 TCTATTAAAT GTTGCCTGCA AGTGAAGTA AGTACTTCCG CAGTTAATAG TTGCGGCAAC GTTGTCTGCA TTGCTACAGG CATCTCTGAG TCAGGCTCTG
AGATAATTA CAGCGGCTCT TCGATCTCAT TCATCAAGCG GTCAATTAAC AAGCGGCTTG CAACTACGCT AAGCATCTCC GTAGCGCCAC AGTGGGAGCA

6101 GGTTCGGTAT GGTTCGCTTC AGCTCGGCTT CCGCAACGAT AAGCGGAGTT ACATGATGCG CCAATGTTGG CAAALAGCG GTTAGCTCTT TCAGTCTCTC
CGAAGCCATA CCGAGGTAAG TCGAGGCCAA GGGTTGCTAG TTCTCGCTGA TGTACTAGGG GGTACGACAC GTTTTCTGCG CAATCGAGCA AGCGAGGAGG

6201 GATCTGTGTC AGAGGTAACT TCGCGGCGGT GTTATCGCTG ATGTATAGG CAGCACTGCA TATTTCTCTT ATGTCTAGC CATCTCTAAG ATCTCTCTCT
CTAGCAACAG TCTCTATTC ACCGCTCTCA CAATATGAG TACCAATACC GTCTCTAGCT ATTAAGAGAA TCAGAGTACG GTAGCGACTG TACGAAAGG

6301 GTGACTGGTG AGTCTCTCAC CAGCTTATTC TGAGAAATAG GTATKGGGCG ACGAGGTGCG TCTTGGCGCG CGTCTATAGG GGAATATACC GCGCCACATA
CAGTGCACAC TCTGAGTGG GTCTAGTAG ACTCTTATCA CATACGCGCG TGTCTTAAGC AGAAGCGGCG CAGGTATAGC CTATTATGG GCGGTCTAT

6401 GCAGAACTTT AAAGGTCTTC ATCAATGAA AACCTTCTTC GCGCGAAGAA CTCTCAAGA TCTTACCGCT GTTGAATCG AGTTCGATTT AACCCACTCG
CGCTTTGAA TTCTCAGAG TAGTACCTT TTGCAAGAG CCGCTCTTT GAGATCTCT AGATGCGCA CAACTCTAGG TCAGCTTCA TTAGCTGAGG

ApalI
6501 TGCACCAAC TGATCTTGG CATCTTTTC TTTCAGCAG GTTTCTGGGT CAGCAAAAC AGCAAGCGAA ATCTCCGCA AAAGCGGAT AAGGCGCGCA
AGTGGCTTG ACTAGAGCT CAGAAATG AAGGTGGTGG CAAAGACTCA CTCTTTTG CCGTCTGCT TTAAGCGCTT TTTTCCCTTA TTCCCGCTGT

6601 CCGAAATGTT CATTACTCAT ACTCTCTT TTCTAATAT ATTGAAGCAT TTATCAGGCT CATCTCTCA TGAGCGGACA CATATCTGAA TGTATTGAG
GCTTTTACA CTATGAGTA TGAGAGGAA AAGTTATTA TAATCTCTTA AATAGTCCA ATACAGAGT ATCTGCTCAT GTATAAATG ACATATATCT

6701 AAATAAACA AATAGGCTT CCGCGCAT TTCCCGGAA AGTCTCACT CAGTCTTAG AAGCGCTTAT TATCTAGCA TTACTTATA AAATAGGCG
TTTATTTGT TTATCCCAA GCGCGTGA AAGGCTTT TCAGCTGAA CTGCAATTC TTGCTAATA ATAGTACTGT AATGCTAT TTTTATCGG

6801 TATCAGAGG CCGTTCTGT TCGCGCTTT CCGTCACTAC GTTCAAAACC TCTACACAT GCACTCTCG CAGAGCTCT CAGCTCTCT GTAGCGGAT
ATAGTCTCG AGAAGGAG ACGGCGGAA GCGACTACT GCACTTTGG AGCTGTGA CCGCGAGGCG CTCTGCGAGT GTGAGAGAA CAGTCTCTTA

ApalI
6901 CCGCGGACA CACAGGCGG TCAGGCGGCG TCAGGCGGCG TTGCGGCGG TCGGCGGCG CTTAACATG CCGCATCAG CCAATCTGTA CTGAGTGC
CGCTCTGT CTCTCGCG AGTCCGCGG AGTCCGCGG AACCGCGG AGCGCGGCG GAATTCATAC GCGCTATCT CTTCTACAT TACTCTCAG

```

Фиг. 2
продовження

ApalI
 7651 ACGATATGCG GGTGAAATA CCGCAGAGT GGTAAAGAG AAAATACCGC ATCAGGCGGC ATTGCGCATT CAGGCTGGGC AACTTTTGGG AAGGGCGATC
 TATATATACG CACACTTTAT GGGGHTCTA GCGATTCCTG TTTTATGCGG TATTCGCGG TAAAGCGTAA GTTCGACGCG TTGACAAACG TTCCGCTTAG
 7701 GGTGGGCGCT TCTTGGCTAT TACGTCAGCT GCGGAAGGG GGAATGGCGT CAGGCGGATT AAGTTGGGTA AGGCGAGGT TTGCGCACTC AGGAGCTGT
 CCAAGCGCGG AGAGGCGATA ATGCGCTCGA CCGCTTTCCG CCGACACGAC GTTCGCTTAA TCGAACCAT TCGGCTCCCA AAGGCTCGAG TCGTGGAGAA
 7801 AAAACGACCG CCGATGAAAT ACACCGCTGT GATCATGGGC CCGCATTAAG ATCTCAATT AATTTGGTC TAATTTAGT TCGATATGAG TAAACAAAT
 TTTTGGTCCG GGTACTTTAA TGTGGCCACA CTAGTACCGG GCGCTAATTT TTAGASTTAA TATAAACCG AGTAATGAA ACCATAACT ATTTTCTTAA
 7901 TCGAACCAAA CCAAAATATA AATATATAGT TTTTATATAT ATGCTTTTAA GACTTTTAT AGAATTTTCT TTAAGAAATA TTAGAAATA CTTCGACTC
 AGCTTTGCTT GGTTTTATAT TTATATATCA AAAATATATA TACGGAATCT CCGAAGAAATA TCTTAAAGAA AATTTTITAT AGATCTTTAT AACCGCTAG
 8001 TTCTGCGATG TAATATTTGG TTAAATATGA AGGCTCCAT TTTTATTAAC TTTAAAGAAAT TCGTCTGACG ATCAGCTCTCT TATCAATTTT TACTAAATG
 AAGACCTTAC ATTATAAAGC AATTTATATC TCGCGAGTA AAAATATATG AATTTATGTA ACCAAGCTGC TAGTGAAGAA ATAGTTCAGA ATGATTTTAC
 8101 GGTCAATCTC TTCTTTCTTC CATATTCATA TGTCAAAAGC TGTCAAAAGT CTATATATCT TTTTCAAAAT TTGAGAGGAA ATTTGATATG TTAAATATA
 GCACTTAGAG AAACAGAGAG GTATATATAT ACAGTTTTCG ATAGTTTAAA GAATATATAG AAAGAGCTTA AACTTCACAT TAAAGCTATT AATTTTATAT
 8201 AATGAAACAT ATCTTATTTT AGGTATCATA TTGATTTTAA TACTTAATTA TTAATTTTGG TTACTTTTGA AAGTTTACAT CAGGAGAAAA TTACTCAAC
 TTACTCTTGA TATATATATA TCGATAGTAT AACTAAATAT ATGATTAATG GATTTAAAGC AATTTGAAAT TTCAACATTA GTTGGCTTTT AATCAGTTTG
 8301 GACTAAATTA AATAAATATC ATGTTTATAT AAGAAATTC TGTATATAGA ATATTTTAAAT AGATCATATG TTTGTAAGAA AATTTAATTT TACTCAACAT
 CTATTTTAT TTATTTATAG TACAGATATA TCTTTTAAAG AGGATATCTT TATTAATATA TCTAGATATC AAGCATTTT TTAAATATA ATGATTTTGG
 8401 ATATATTTAT TTATCAAAAG TTTCGCAAG TAAATTTAAA ATATATTTCA TGTACAAAG AAAGAAACAG AATATCTGCA AAACCGGCTA AAACCGAAGC
 TATATTAATG AATAGTTTTT AACTGTTTT ATCTATATTT TATATATAGT AATTTTATTT TTCTTCTCTC TTTTCTGACT TTTGAGCTTT TTGAGCTTGG
 8501 AATCGAAAGC GATATAGTGG GTTTGGTTTG ATTTTGMAT AAACCGAAGC AACTCGCTCC ATTGCAAGC CTATCTATAT TACCTTAAAT ATTTGAGAT
 TTAGCTTTGG CTATATCTAC CAAGCAAGC TAAACATATA TTTGCTTGG TTAGCGCGGG TAAAGCTTGG GATTTAGTAT ATCGAATTA TAAAGTTCTA
 8601 ATATATATAT TAAGTTTGGC AATATCTCTG AATTTTGGCA AATATATCTA AGCTATATG GGTGATATAT GAATTTAAAG CAGCTTGGAT GTTGGTATTA
 TATATATCTA ATTCGACAG TTATGAGAGC TTAAAGAGCT TTACTATAGT TCGGATATAT CCGATTTATA CTAAATTTT CAGCTGAGTA CAGCACTATT
 8701 TATGTAATTT ACTTATTTCT AAAAATATAT CCAAGATAT ATATATTTCT GCTAGGAAGA AGGTTAGCTA GATTTTACAG CAAGCGGGA ATACATGAA
 ATACATGAA TGAACATAGA TTTTATATA GGTTCATATA TATTTAAGA CAGTCTCTCT TCAATCTCT CTAAAGTCT GTTGGCTCT TATGTTACTT

Fig. 2
продовження

8801 CCGTAAAGTG ATGGAAGCTC GAAATATAGC AAGGAACAAA TATTTTAAAG AAATATGCGA ATGCTTGGGA ACAGAGAA GTGATATATT TTTGCTCT
 GGTATTTGAC TAAGTTCGAG CTATATATGC TCGTTTCTTT ATAAATATTT TTATATGCGT TATGAAAGCT TGTATCTTT CACTATATAG AAAGCAAGAA
 8901 AAAGCAAGAT CCGCTCTAAG GAATGGCGGT TTTCTTTTGC ATGTAAGTAT TATGCTGCTT TCGTATGAAA AATTTTGGAC TACTATGCG AACTTCTCT
 TTTCTTCTTA GGGGAGATTT CTGACGCTCA AAGGAAGCG TACTTTGATA ATAGGAGGGA AGCAATGTTT TTAAGCTCT ATGATAGCC TTGAGAGAGG
 SmaI
 XbaI
 NdeI
 9401 GAAATATATG CCGACCGCTT AATTAAGGCG CCGCTGCTCC GAGCAAGC
 CTATATGAC CCGTACGAAA TTAATTTGCG GGTATAGGG CCGTTTGG

Fig. 2
продовження

```

GCAGCCNGANATGCCCGCGGTTNGTGATATCGTTAACCATTACATTGAGACGCTCTACAG
||||| ||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||
GCAGC-TGATATGCCCGCGGTTTGTGATATCGTTAACCATTACATTGAGACG-TCCTACAG

TGAACCTTTAGGACAGAGCCACAAACACCACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGTTGC
||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||
TGAACCTTTAGGACAGAGCCACAAACACCACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGTTGC

AAGATAGATACCCCTTGCTTGCTTGCTGAGGTTGAGGGGTGTTGTGGCTGGTATTGCTTACG
||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||
AAGATAGATACCCCTTGCTTGCTTGCTGAGGTTGAGGGGTGTTGTGGCTGGTATTGCTTACG

CTGGGCCCTGGAAGGCTAGGAACGCTTACGATTGGACAGTTGAGAGTACTGTTTACGTTGT
||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||
CTGGGCCCTGGAAGGCTAGGAACGCTTACGATTGGACAGTTGAGAGTACTGTTTACGTTGT

CACATAGGCATCAAGGTTGGGCCCTAGGATCTACATTGTACACACATTGCTTAAAGTCTA
||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||
CACATAGGCATCAAGGTTGGGCCCTAGGATCTACATTGTACACACATTGCTTAAAGTCTA

TGGAGGCGCAAGGTTTAAAGTCTGTGGTTGCTGTTATAGGCCTTCCAAACGATCCATCTG
||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||
TGGAGGCGCAAGGTTTAAAGTCTGTGGTTGCTGTTATAGGCCTTCCAAACGATCCATCTG

TTAGGTTGCATGAGGCTTTGGGATACACAGCCCGGGTACATTGCCGCGCAGCTGGATACA
||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||
TTAGGTTGCATGAGGCTTTGGGATACACAGCCCGGGTACATTGCCGCGCAGCTGGATACA

AGCATGGTGGATGGCATGATGTTGGTTTGGCAAAGGGATTTTGAGTTGCCAGCTCCTC
||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| ||||||||||| |||||||
AGCATGGTGGATGGCATGATGTTGGTTTGGCAAAGGGATTTTGAGTTGCCAGCTCCTC

CAAGGCCAGTTA
|||||
CAAGGCCAGTTA

```

Верхньою послідовністю є вихідна послідовність PAT з Genbank (NCBI).

Нижньою послідовністю є PAT із GUP-продукту на геномній ДНК трансгенної рослини *Arabidopsis*, одержаної опосередкованою Superfect трансформацією

Фіг. 3

```

GCCAGCCTGGGCAAGGTGATGCCAG-TTCATCTGCACCACCGGCGATGTGCCCGTGCC
||||| ||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
GCCAGAGNGGNCNGGTGGATGCCAGGTTTCATCTGCACCACCGGCGATGTGCCCGTGCC

CTGGAGCACCC-TGG-TGACCAACCTGACCTACGGCGGCCCAATGGCTCGCCAAAGTACGGC
||||| ||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
CTGGAGCNCCTTGGATGACCACCTGAGCTACGGCGGCCAGTGCTTCGCCAAAGTACGGC

CCCGAGCTGAAGGATTTCTACAAGAGCTGCATGCCCGATGGCTACGTGCAGGAGCGCACCC
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
CCCGAGCTGAAGGATTTCTACAAGAGCTGCATGCCCGATGGCTACGTGCAGGAGCGCACCC

ATCACCTTCGAGGGCGATGGCAATTTCAAGACCCGCGCGAGGTGACCTTCGAGAATGGC
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
ATCACCTTCGAGGGCGATGGCAATTTCAAGACCCGCGCGAGGTGACCTTCGAGAATGGC

AGCGTGTACAATCGCTGAAGCTGAATGCCCAGGCTTCAAGAAGGATGG
| |||| |||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
NGNNTGTANAATCNGTNNAGCTGAATGCCCANGCTTCNANAANGNTGG

```

Верхньою послідовністю є вихідна послідовність Phi-YFP

Нижньою послідовністю є YFP із ПЛР-продукту на геномній ДНК трансгенної рослини *Arabidopsis*, одержаної опосередкованою Superfect трансформацією

Fig. 4

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601