



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201617451 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：104137007

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 11 月 10 日

(51)Int. Cl. : C12N15/82 (2006.01)

C07H21/04 (2006.01)

(30)優先權：2014/11/11 美國

62/078,214

(71)申請人：陶氏農業科學公司(美國) DOW AGROSCIENCES LLC (US)

美國

(72)發明人：庫瑪 山迪普 KUMAR, SANDEEP (IN)；比林格 傑佛瑞 R BERRINGER, JEFFREY R. (IN)；陳偉 CHEN, WEI (CN)；艾斯貝瑞 安德烈 M ASBERRY, ANDREW M. (US)

(74)代理人：惲軼群

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：52 項 圖式數：5 共 80 頁

(54)名稱

合成雙向植物啟動子

SYNTHETIC BI-DIRECTIONAL PLANT PROMOTER

(57)摘要

此揭示係有關於促進植物或植物細胞中的核苷酸序列之轉錄的組成物和方法，其係使用一種來自玉蜀黍(Zea mays)泛素-1 基因啟動子之最小核心啟動子元素，以及來自稻米泛素-3(Rubi3)啟動子之全長核苷酸序列。一些具體例係有關於一種合成雙向啟動子，其可以於植物中起作用來促進二個可操縱地鏈接的核苷酸序列之轉錄。

This disclosure concerns compositions and methods for promoting transcription of a nucleotide sequence in a plant or plant cell, employing a minimal core promoter element from a Zea mays Ubiquitin-1 gene promoter, and the full length nucleotide sequence elements from a Rice Ubiquitin-3 promoter. Some embodiments relate to a synthetic bi directional promoter that may function in plants to promote transcription of two operably linked nucleotide sequences.

發明摘要

※ 申請案號：104137007

※ 申請日：104.11.10

※IPC 分類：

C12N 15/82 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

合成雙向植物啟動子

SYNTHETIC BI-DIRECTIONAL PLANT PROMOTER

【中文】

此揭示係有關於促進植物或植物細胞中的核苷酸序列之轉錄的組成物和方法，其係使用一種來自玉蜀黍(*Zea mays*)泛素-1基因啟動子之最小核心啟動子元素，以及來自稻米泛素-3(Rubi3)啟動子之全長核苷酸序列。一些具體例係有關於一種合成雙向啟動子，其可以於植物中起作用來促進二個可操縱地鏈接的核苷酸序列之轉錄。

【英文】

This disclosure concerns compositions and methods for promoting transcription of a nucleotide sequence in a plant or plant cell, employing a minimal core promoter element from a *Zea mays* Ubiquitin-1 gene promoter, and the full length nucleotide sequence elements from a Rice Ubiquitin-3 promoter. Some embodiments relate to a synthetic bi directional promoter that may function in plants to promote transcription of two operably linked nucleotide sequences.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ ）圖。（無）

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

合成雙向植物啟動子
SYNTHETIC BI-DIRECTIONAL PLANT PROMOTER

【技術領域】

優先權主張

[0001]本申請案主張 2014 年 11 月 11 日提申，
“SYNTHETIC BI DIRECTIONAL PLANT PROMOTER”之
美國臨時專利申請案第62/078,214號的利益。

發明領域

[0002]本揭示一般而言係有關於促進植物或植物細胞
中的核苷酸序列之轉錄的組成物和方法。一些具體例係有
關於一種合成稻米泛素-3 (Rubi3)雙向啟動子，其於植物中
作用以促進一種可操縱地鏈接的核苷酸序列之轉錄。特定
的具體例係有關於含括一種合成啟動子的方法(例如，導入
一種核酸分子至細胞內)以及包含合成啟動子之細胞、細胞
培養物、組織、生物體及生物體的部分，以及由此生產的
產物。

【先前技術】

發明背景

[0003]許多的植物物種能夠以來自其他的物種的轉基
因(transgenes)予以轉形以導入農藝上所欲的性狀或特徵，
舉例而言，改善營養價值品質、增加產量、賦予害蟲或疾
病之抗性、增加乾旱與壓力耐受性、改善園藝品質(例如色

素沈著與生長)、授予除草劑抗性、賦予生產來自植物之工業上有用的化合物及/或材料的能力,及/或賦予藥物生產的能力。導入轉基因至植物細胞內以及含有轉基因之穩定整合複本的可孕性基因轉殖植物之隨後的回收可以引致擁有所欲的性狀或特徵之基因轉殖植物的生產。

[0004]基因表現的控制與調控能透過許多的機制而發生。一種基因之轉錄起始為基因表現之主要的控制機制。轉錄的起始一般係藉由位於轉錄的基因之5'的側面或上游區域的多核苷酸序列來控制。此等序列全體稱之為啟動子。啟動子一般含有RNA聚合酶開始轉錄的訊息以便能生產信使RNA(mRNA)。成熟的mRNA係藉由核糖體予以轉錄,由此合成蛋白質。結合DNA的蛋白質與啟動子DNA序列特異地互相作用以促進轉錄複合物的形成以及起始基因表現進程。有各種各樣的真核啟動子由植物單離且予以特徵化,其等對於驅動植物內的轉基因之表現為有功能性的。影響基因對環境的刺激的反應、營養的可利用性,或是不利的病況,包括熱休克、厭氧生活或是存在重金屬,之表現的啟動子業已被單離且特徵化。亦有在整個發育期間或是以組織,或器官特異的方式來控制基因表現的啟動子。此外,由細菌與病毒單離的原核的啟動子業已被單離以及予以特徵化,其等對於驅動植物內的轉基因之表現為有功能的。

[0005]一種能在真核細胞中表現的典型啟動子係由最小啟動子與其他的順式元素所組成的。最小啟動子實質上

爲一種TATA盒區域，RNA聚合酶II(polII)、TATA結合蛋白質(TBP)，以及TBP附著因子(TAFs)可以結合至TATA盒區域以起始轉錄作用。然而於大部分的情況中，除了TATA部分(motif)，還需要序列元素以準確的轉錄。已經發現此等序列元素(舉例而言，增強子)通常以位置及/或方向無關性的方式來提高附近的基因之整體的表現位準。一些polII基因的轉錄起始位址(舉例而言，INR序列)附近之其他的序列可以提供對轉錄活化亦有貢獻之因子任擇的結合位址，甚至是任擇地提供轉錄的核心啓動子結合位址給缺少功能性TATA元素的啓動子。Zenzie-Gregory等人(1992) *J. Biol. Chem.* 267: 2823-30。

[0006]其他的基因調節元素包括與特異性的DNA的結合因子互相作用的序列。此等序列的部分有時提及爲順式元素，以及通常爲位置依賴性和方向依賴性，雖然可能會發現其等對一基因的編碼序列爲5'或是3'，或是位於一種內含子內。會單獨地或是以組合方式結合組織特異性的或是發育特異性的轉錄因子之此等順式元素，可以決定啓動子的轉錄位準之時空表現模式。一個最小啓動子跟隨的上游順式元素之配置，典型地建立特定的啓動子之極性。已經選殖且廣泛地使用於基礎研究和生物科技應用兩者之植物內的啓動子一般爲單向的，僅僅指示已經融合於其之3'端(亦即，下游)的一個基因。見，Xie等人(2001) *Nat. Biotechnol.* 19(7):677-9；美國專利第6,388,170號。

[0007]植物啓動子內已經鑑定出許多的順式元素(或

“上游調節序列”)。此等順式元素於可操縱地連結的基因上以其等運用之控制的類型上廣泛地變化。一些元素作用來增加可操縱地連結的基因因應環境的反應(舉例而言，溫度、濕氣，以及傷損)之轉錄。其他的順式元素能對發育的提示(舉例而言，發芽、種子成熟，以及開花)作出反應或是對空間資訊(舉例而言，組織特異性)作出反應。見，舉例而言，Langridge 等人(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3219-23。特異性啓動子元素之控制的類型典型爲啓動子之內在的品質；亦即，在此一啓動子控制之下的異源性基因之表現很可能會取決於單離出啓動子元素之天然的基因之控制。同上。此等元素亦典型可以與其他的元素交換以及維持其等對於基因表現之特有的內在控制。

[0008]代謝工程和性狀堆疊(trait stacking)通常必需導入多重基因至植物內，該等基因屢屢透過同一的啓動子或是同源啓動子來控制。然而，當多重導入的轉基因具有同源啓動子驅動其等時，很可能出現同源爲基礎的基因靜默(homology based gene silencing) (HBGS)。Mol等人(1989) *Plant Mol. Biol.* 13:287-94。因此，業已有報導HBGS廣泛地發生於基因轉殖植物之內。見，舉例而言，Vaucheret and Fagard (2001) *Trends Genet.* 17:29-35。已經有暗示數個機制來解釋HBGS現象，其等之全部均包括以下特徵，啓動子內的序列同源性會觸發細胞的識別機制導致重複基因的靜默。Matzke and Matzke (1995) 47:23-48；Fire (1999) *Trends Genet.* 15:358-63；Hamilton and Baulcombe (1999) *Science*

286:950-2；Steimer等人(2000) Plant Cell 12:1165-78。再者，重複使用相同的啟動子來獲得不同轉基因相似位準的表現模式，會引致重複的啟動子中轉錄因子(TF)結合位址之過渡競爭，會造成內源性TFs之耗盡並且會導致轉錄的向下調節。

[0009]鑑於在一基因轉殖品件之單一位址內強壯的整合表現多重基因性狀的需求越來越大；提供降低創造此等基因轉殖品件有關的技術挑戰之解決方案是重要的。更特別地，此種涉及發展功能上等效但是具有最小的序列同源性之合成啟動子，避免基因轉殖植物內之HBGS的策略是所希望的。當使用此等合成啟動子來表現作物植物內的轉基因時，其等可以協助避免或是減少HBGS。Mourrain等人(2007) Planta 225(2):365-79；Bhullar等人(2003) Plant Physiol. 132:988-98。

【發明內容】

揭示

[0010]於本揭示之具體例中，本揭示係有關於一種合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啟動子，其包含來自一種稻米泛素-3啟動子及一種玉蜀黍(*Zea mays*)泛素-1 (Ubiquitin-1)啟動子之數個啟動子元素。於一另外的具體例中，本揭示包含各種啟動子元素。因而，該等啟動子元素包含一種內含子。於一些例子中，該等啟動子元素包含一種5'UTR。此外，該等啟動子元素包含一種上游啟動子元素。再者，該等啟動子元素包含一種最小核心啟動子。於本揭示之具體例

中，本揭示係有關於一種用於生產基因轉殖植物細胞的方法，該方法包含以下步驟：a)用一種基因表現匣來轉形一種細胞，該基因表現匣包含一種合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啟動子，其可操縱地鏈接至至少一感興趣的多核苷酸序列；b)單離包含該基因表現匣之轉形的植物細胞；及，c)生產一基因轉殖植物細胞，其包含可操縱地鏈接至至少一感興趣的多核苷酸序列之該合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啟動子。於本揭示之具體例中，本揭示係有關於一種用於表現感興趣的多核苷酸序列於植物細胞內的方法，該方法包含將該感興趣的多核苷酸序列導入至該植物細胞內，該感興趣的多核苷酸序列係可操縱地連結至一合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啟動子。於本揭示之具體例中，本揭示係有關於一種基因轉殖植物細胞，其包含該合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啟動子。

[0011]從下列數個參照附圖進行的具體例之詳細說明，前述特徵及其它特徵將變得更為明顯。

【圖式簡單說明】

[0012]圖1：pDAB113122之質體圖。

[0013]圖2：pDAB113142之質體圖。

[0014]圖3：用建構物pDAB113122或pDAB113142任一者轉形的玉米植物之V6葉組織中Cry34表現的圖。

[0015]圖4：用建構物pDAB113122或pDAB113142任一者轉形的玉米植物之V6葉組織中Cry35表現的圖。

[0016]圖5：用建構物pDAB113122或pDAB113142任一

者轉形的玉米植物之V6葉組織中AAD-1表現的圖。

【實施方式】

進行本發明之模式

I. 數個具體例概述

[0017]基因轉殖植物的發展變得越來越複雜，且典型需要堆疊(stacking)多重轉基因至一單一的基因座之內。見Xie等人之(2001) Nat. Biotechnol. 19(7):677 9。因各個轉基因通常會需要一種獨特的啓動子用於表現，所以需要多重啓動子來表現一個基因堆疊之內不同的轉基因。除了會增加基因堆疊的尺寸之外，此還會頻繁地導致重複使用相同的啓動子來獲得不同轉基因相似位準的表現模式。此方法常常有問題，因為由相同的啓動子驅動多重轉基因之表現可能導致基因靜默或HBGS。重複的啓動子中轉錄因子(TF)-結合位址之過渡競爭，會造成內源性TFs之耗盡且導致轉錄的向下調節。轉基因的靜默對於一種生產來表現轉基因的基因轉殖植物之性能而言是不受歡迎的。於一種轉基因之內的重複序列通常為導致基因座內的同源重組，而造成多核苷酸的重排以及非所欲的表型或農藝的性能。

[0018]使用於基礎研究或是生物科技應用之植物的啓動子一般為單向的，以及僅僅調控已經融合於其之3'端(下游的)的一個基因。爲了生產具有各種所欲的性狀或特徵之基因轉殖植物，使展開來驅動編碼所欲的性狀或特徵之轉基因的表現之啓動子數量降低會是有用的。尤其是在必需導入多重轉基因至植物內用於代謝工程和性狀堆疊的應用

上，藉此多重啓動子必需驅動多重轉基因的表現。藉由發展能驅動該啓動子的側面之二個轉基因表現的一種單一稻米泛素-3合成雙向啓動子，可以降低發展基因轉殖作物所需要的啓動子總數，藉此減少重複使用相同的啓動子、降低基因轉殖建構物的尺寸及/或降低HBGS的可能性。此一種啓動子可以藉由以新穎的或是合成性延伸(stretch)的DNA導入已知的順式元素而產生，或是任擇地藉由“領域調換(domain swapping)”而產生，其中一個啓動子的領域係以來自其他的異源性啓動子之功能上等效的領域來代替。

[0019] 本文的具體例使用一種方法，其中一種來自稻 (*Oryza sativa*) (稻米(Rice)) 泛素-3基因的單向啓動子(舉例而言，Rubi3)係使用來設計一種合成稻米泛素-3雙向啓動子，以使得一個啓動子可以指示二個基因的表現，一者於該啓動子的各端上。合成稻米泛素-3雙向啓動子可以允許熟悉此藝者堆疊轉基因於植物細胞和植物之內，同時減少相同的啓動子之重複使用且降低轉基因建構物的尺寸。再者，以一種單一合成稻米泛素-3雙向啓動子來調節二個基因的表現也可以提供於相同的條件下共表現2個基因的能力，例如，舉例而言，當二個基因各自貢獻單一的性狀於宿主內時，可以爲有用的。於一些事例中已經報導使用雙向功能的啓動子於植物內，包括玉蜀黍(*Zea mays*)泛素1啓動子(國際專利公開案WO2013101343 A1)，CaMV 35啓動子(Barfield and Pua (1991) Plant Cell Rep. 10(6-7):308-14；Xie 等人(2001)，如前文)，以及*mas*啓動子(Velten等人(1984))

EMBO J. 3(12):2723-30 ; Langridge等人(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3219-23)。

[0020]植物基因內之基因表現的轉錄起始和調變係由全體配置於啓動子之內的各種各樣的DNA序列元素來指示。真核啓動子由最小核心啓動子元素(minP)，以及另外的上游調節序列(URSs)所組成。該核心啓動子元素爲足以指示準確的轉錄起始之最小延伸之連續的DNA序列。植物內的核心啓動子也包含與轉錄起始有關聯的典型區域，例如CAAT和TATA盒。TATA盒元素通常坐落於轉錄起始位址之上游的大概20至35個核苷酸之處。

[0021]minP之活化取決於URS，各種各樣的蛋白質結合至URS以及URS隨後與轉錄起始複合物互相作用。URSs包含DNA序列，此DNA序列決定包含URS之啓動子的時空表現模式。啓動子的極性通常由minP的方向來決定，而URS爲雙極性的(亦即，其作用與其之方向無關)。

[0022]於一些具體例之特定實例中，由玉蜀黍自交系，B73，原始衍生自玉蜀黍(*Zea mays*)之經修飾的玉蜀黍(*Zea mays*)泛素1啓動子(ZmUbi1)之最小核心啓動子元素(minUbi10P)，使用來建造一種合成稻米泛素-3雙向啓動子，其於植物內作用以提供相對於先前所描述到的雙向啓動子爲獨特的特徵之表現控制。具體例包括一種合成稻米泛素-3雙向啓動子，其進一步包括一種衍生自天然玉蜀黍(*Zea mays*)泛素-1啓動子之最小核心啓動子元素(minPZmUbi1)。

[0023]原始衍生自玉蜀黍(*Zea mays*)c.v. B73的ZmUbi1啓動子包含位於玉米(maize)基因組之內、轉錄起始位址的5'之大約899個鹼基，以及進一步於轉錄起始位址的3'之大約1,093個鹼基之內的序列。Christensen等人(1992) *Plant Mol. Biol.* 18(4):675-89(描述一種玉蜀黍(*Zea mays*)c.v. B73 ZmUbi1基因)。於一些實例中使用的一種由B73衍生之經修飾的ZmUbi1啓動子爲大概2 kb啓動子，其含有一個TATA盒；二個重疊的熱休克一致元素；緊緊相鄰轉錄起始位址之82個或是83個核苷酸(取決於參考股)前導子序列，其於本文係提及爲ZmUbi1外顯子；以及一個1015-1016個核苷酸內含子。由玉蜀黍(*Zeas*)物種和玉蜀黍(*Zea mays*)基因型所衍生之其他的玉米(maize)泛素啓動子變異體，於TATA元素和上游的熱休克一致元素所構成的minP元素附近，可以展示出高的序列守恆性。因而，本發明之具體例係透過使用ZmUbi1啓動子之此短的(~200 nt)高度守恆區(舉例而言，序列辨識編號：2)作爲一種用於建構合成雙向植物啓動子之最小核心啓動子元素來舉例說明。

[0024]原始衍生自稻(*Oryza sativa*)之稻米泛素-3啓動子含有座落於稻米基因組之內、轉錄起始位址的5'之大約1,990個鹼基。E Sivamani，以及R Qu(2006) *Expression enhancement of a rice polyubiquitin promoter. Plant Molecular Biology* 60: 225-239。於一些實例中使用的一種衍生自稻(*Oryza sativa*)之經修飾的稻米泛素-3啓動子爲大概2 kb啓動子，其含有一個TATA盒，5'UTR/內含子序列，

以及座落於稻米泛素-3編碼序列起始處之一個下游增強元素。由稻(*Oryza*)物種和稻(*Oryza sativa*)基因型所衍生之其他的稻米泛素-3啓動子變異體此等啓動子元素附近，可以展示出高的序列守恆性。

II. 縮寫

[0025] AtUbi10	阿拉伯芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)泛素10
BCA	二喹啉甲酸(bicinchoninic acid)
CaMV	花椰菜嵌紋病毒(cauliflower mosaic virus)
CsVMV	木薯葉脈嵌紋病毒(cassava vein mosaic virus)
CTP	葉綠體運送胜肽
HBGS	同源為基礎的基因靜默
minUbi1P	ZmUbi1最小核心啓動子
OLA	寡接合擴增
PCR	聚合酶連鎖反應
RCA	滾環式擴增
RUbi3	稻米泛素-3
RT-PCR	反轉錄酶PCR
SNuPE	單一核苷酸引子延伸
URS	上游調節序列
ZmUbi1	玉蜀黍泛素1

III. 術語

[0026]許多術語使用於本申請案各處。爲了提供本說明書與請求項清楚且一貫的理解，包括此等術語給定的範圍，提供下面的定義：

[0027]內含子：當使用於本文中，術語“內含子”係提及一基因(或表現的感興趣之多核苷酸序列)之內所包含的任何核酸序列，其經轉錄但是未被轉譯。內含子包括表現的DNA序列之內的未轉譯的核酸序列，以及從那裡轉錄的RNA分子內之對應的序列。

[0028]經單離的：一種“經單離的”生物組份(諸如核酸或蛋白質)實質上已與生物體細胞中，該成份天然發生區域中的其他生物成分(意即，其他染色體及染色體外的DNA及RNA，及蛋白質)分隔、分開製造或純化開來，同時造成組份內之化學或功能變化(舉例而言，一核酸可藉由打斷連接核酸至染色體內其餘的DNA之化學鍵而單離)。業已“經單離的”核酸分子和蛋白質包括藉由標準的純化方法而純化的核酸分子和蛋白質。該術語亦包括藉由重組表現於宿主細胞內來製備的核酸和蛋白質，以及化學合成的核酸分子、蛋白質，以及胜肽。

[0029]基因表現：一種核酸轉錄單元(包括，舉例而言，基因組DNA)之編碼資訊係透過該基因表現方法而轉變成一細胞之操縱的、非操縱的，或是結構的部分，通常包括一蛋白質的合成。基因表現可以被外部的訊息影響；舉例而言，一細胞、組織，或是有機體暴露於會增加或是減少基因表現的製劑。一種基因的表現亦可以在由DNA至RNA

至蛋白質的途徑中任何地方予以調節。基因表現的調控，舉例而言，會透過控制對於轉錄、轉譯、RNA運輸和加工、中間分子例如mRNA的降解之作用，或是在特異性蛋白質分子已經製造之後透過其等的活化、不活性化、分室作用，或是降解，或是透過其等之組合而發生。基因表現可以透過本技藝已知的任何方法來測量RNA位準或是蛋白質位準，包括，且不限於，北方墨點、西方墨點，或是活體外、原位，或是活體內的蛋白質活性分析。

[0030]同源為基礎的基因靜默：當使用於本文中，“同源為基礎的基因靜默”(HBGS)係包括轉錄基因靜默和轉錄後基因靜默兩者的通稱。標靶基因座經由無鏈接的靜默基因座之靜默可以起因於轉錄的抑制(轉錄基因靜默；TGS)或是mRNA降解(轉錄後基因靜默；PTGS)，由於分別對應於啟動子或轉錄的序列之雙股的RNA(dsRNA)的生產。各個方法內涉及相異的細胞組份暗示著dsRNA誘導的TGS和PTGS很可能起因於古老的共同機制之多樣化。然而，嚴格的比較TGS和PTGS已經不容易完成，因為其一般依賴相異的靜默基因座之分析。吾人描述一種觸發TGS和PTGS兩者之單一轉基因的基因座，由於dsRNA的生產對應於不同的標靶基因之啟動子及轉錄的序列。Mourrain等人(2007) *Planta* 225:365-79。siRNAs很可能為觸發同源序列之TGS和PTGS之實際的分子：siRNAs於此模式中會透過擴展轉基因序列的甲基化成內源性啟動子，而觸發順式以及反式的同源序列之靜默和甲基化。同前。

[0031] 核酸分子：當使用於本文中，如於此所使用，術語“核酸分子”(或“核酸”或“多核苷酸”)可以意指核苷酸的聚合物形式，該者可包括RNA之意義股與反義股兩者、cDNA、基因組DNA，及上述的合成形式與混合聚合物。一種核苷酸可以意指一核糖核苷酸、去氧核糖核苷酸、或任一類型核苷酸的修飾形式。一種“核酸分子”當使用於本文中，如於此所使用係同義於“核酸”及“多核苷酸”。一核酸分子之長度通常為至少10個鹼基，除非另有說明。該術語可提及一個不確定長度的RNA或DNA分子。該術語包括單股和雙股形式的DNA。一種核酸分子可以包括天然存在的核苷酸及藉由天然存在及/或非天然存在的核苷酸鏈結而連結在一起之經修飾的核苷酸之任何一個或兩者。

[0032] 核酸分子可以予以化學或生物化學修飾，或是可以含有非天然或衍生的核苷酸鹼基，如熟習該項技藝者將容易體會的。此種修飾包括，舉例而言，標示、甲基化、以一類似物取代一個或多個天然存在的核苷酸、核苷酸間修飾(例如不帶電荷的鏈結：舉例而言，磷酸甲酯、磷酸三酯、胺基磷酸酯(phosphoramidates)、胺基甲酸酯等等；帶電鏈結：舉例而言，硫代磷酸酯(phosphorothioates)、二硫代磷酸酯等等；懸垂(pendent)部分：舉例而言，胜肽；插入劑(intercalator)：舉例而言，吡啶、補骨脂素(psoralen)等等；螯合劑；烷化劑(alkylators)；及修飾鏈結：舉例而言， α -變旋異構體(alpha anomeric)核酸等等)。術語“核酸分子”亦包括任何拓撲構形，包括單股、雙股、部分雙聯體

(duplexed)、三聯體、髮夾形、圓形以及扣鎖式(padlocked)構形。

[0033]轉錄係以5'至3'的方式沿著DNA股進行。此意指RNA係藉由連續的添加核糖核苷酸-5'-三磷酸至生長鏈的3'端(連同必要的消去焦磷酸鹽)來實行。於線狀的或環狀的核酸分子內，設若離散的元素(舉例而言，特定的核苷酸序列)結合或將結合至離該元素的5'方向上之相同的核酸，則其等相關於另外的元素可以係提及為“上游的”或“5'”。同樣地，設若離散的元素結合或將結合至離該元素的3'方向上之相同的核酸，其等相關於另外的元素可以為“下游的”或是“3'”。

[0034]當使用於本文中，一鹼基“位置”係提及指定的核酸內已知的鹼基或核苷酸殘基的位置。指定的核酸可以是用一種參考核酸經由排列(參見以下)來界定。

[0035]雜交：寡核苷酸和其等之類似物藉由介於互補的鹼基之間的氫鍵結而雜交的過程，氫鍵結包括華特生-克里克(Watson-Crick)、胡思町(Hoogsteen)或反胡思町氫鍵結。大體而言，核酸分子由嘧啶(胞嘧啶(C)、尿嘧啶(U)，以及胸嘧啶(T))或是嘌呤(腺嘌呤(A)和鳥糞嘌呤(G))之含氮鹼基所組成。此等含氮鹼基於嘧啶和嘌呤之間形成氫鍵，以及嘧啶與嘌呤的鍵結係提及為“鹼基配對”。更特別地，A會氫鍵結至T或U，以及G會鍵結至C。“互補的”係提及介於二個相異的核酸序列之間的或相同的核酸序列之二個相異的區域之間發生的鹼基配對。

[0036]“特異性雜交的”和“特異性互補的”為術語，其表示足夠程度的互補性，以使得寡核苷酸和DNA或RNA標靶之間發生穩定且特異性的結合。寡核苷酸對於其之特異性雜交的標靶序列不須要為100%互補的。當一種寡核苷酸結合至標靶DNA或是RNA分子時會干擾標靶DNA或是RNA正常的功能，以及有足夠程度的互補性以於希望特異性的結合之條件下避免寡核苷酸對非標靶序列之非特異性結合，舉例而言就活體內的分析或是系統來說為生理的條件下，該寡核苷酸為特異性雜交的。此結合係提及為特異性的雜交。

[0037]導致特定程度的嚴格度之雜交條件會取決於所選擇的雜交方法的本質以及雜交的核酸序列之組成和長度，而有所不同。大體而言，雜交的溫度和雜交緩衝液的離子強度(尤其Na⁺及/或Mg²⁺濃度)會對雜交的嚴格度有貢獻，然而清洗時間也會影響嚴格度。關於達到特定程度的嚴格度所需要的雜交條件之計算係討論於Sambrook等人(ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989，第9及第11章之內。

[0038]當使用於本文中，“嚴格的條件”包含條件，在該條件下雜交將只發生於如果雜交的分子和DNA標靶之間有低於50%失配時。“嚴格的條件”包括進一步特定位準的嚴格度。因而，當使用於本文中，“中度嚴格度”的條件為帶有超過50%序列失配的分子不會雜交的該等條件；“高嚴格度”

的條件為帶有超過20%失配的序列不會雜交的該等條件；以及“非常高嚴格度”的條件為帶有超過10%失配的序列不會雜交的該等條件。

[0039]於特定的具體例中，嚴格條件可以包括在65°C下進行雜交，接著以0.1x SSC/0.1% SDS在65°C下清洗歷時40分鐘。

[0040]下列為代表性的、非限制性雜交條件：

非常高嚴格度：於5x SSC緩衝液內在65°C下進行雜交歷時16小時；以2x SSC緩衝液於室溫清洗2次每次歷時15分鐘；以及以0.5x SSC緩衝液於65°C清洗2次每次歷時20分鐘。

[0041]高嚴格度：於5x-6x SSC緩衝液內在65-70°C下進行雜交歷時16-20小時；以2x SSC緩衝液於室溫清洗2次每次歷時5-20分鐘；以及以1x SSC緩衝液於55-70°C清洗2次每次歷時30分鐘。

[0042]中度嚴格度：於6x SSC緩衝液內在室溫至55°C下進行雜交歷時16-20小時；以2x-3x SSC緩衝液於室溫至55°C清洗至少2次每次歷時20-30分鐘。

[0043]於特定的具體例中，可特異雜交的核酸分子能於非常高嚴格度的雜交條件下保持為結合的。於此等與另外的具體例中，可特異雜交的核酸分子能於高嚴格度的雜交條件下保持為結合的。於此等與另外的具體例中，可特異雜交的核酸分子能於中度嚴格度的雜交條件之下保持為結合的。

[0044]寡核苷酸：一種寡核苷酸係一種短的核酸聚合物。寡核苷酸可以藉由切割較長的核酸段而形成，或是藉由聚合個別的核苷酸前驅體而形成。自動合成器允許長度高達數百個鹼基對的寡核苷酸之合成。因為寡核苷酸可以結合至一種互補的核苷酸序列，所以它們可以使用做為偵測DNA或RNA的探針。由DNA組成的寡核苷酸(寡去氧核糖核苷酸)可以使用於PCR，PCR為擴增小的DNA序列之技術。於PCR方面，寡核苷酸典型地提及為一“引子”，其允許DNA聚合酶延伸寡核苷酸以及複製互補股。

[0045]序列同一性(Sequence identity)：當使用於本文中，兩個核酸或多肽序列之上下文中之術語“序列同一性”或“同一性”，可以指當通過明確的比較視窗來對準最大的對應時，2個序列之間相同的殘基。

[0046]當使用於本文中，術語“序列同一性的百分比”係提及經由通過比較視窗來比較2個最佳對準的序列(舉例而言，核酸序列，和胺基酸序列)而決定的值，其中比較視窗內的序列部份當與參考序列(其不含有加入或刪失)相比時，為了2個序列之間的最佳對準可以含有有加入或刪失(亦即，空格)。百分比係藉由以下方式來計算：決定2個序列之間同一的核苷酸或胺基酸殘基發生的位置之數量以獲得匹配的位置之數量，將匹配的位置之數量除以比較視窗內總位置之數量，以及將結果乘上100來獲得序列同一性的百分比。

[0047]用於對準要比較的序列的方法為本技藝所熟知

的。各種程式與對準演算法係說明於，舉例而言：Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482；Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443；Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444；Higgins and Sharp (1988) *Gene* 73:237-44；Higgins and Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-3；Corpet等人(1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90；Huang等人(1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65；Pearson等人(1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-31；Tatiana等人(1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50，之內。序列對準的方法及同源性計算之詳細考慮因素可以於，舉例而言，Altschul等人(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10內找到。

[0048]國家生物資訊中心(NCBI)基本局部對準搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool) (BLAST；Altschul等人(1990))可以從數個來源得到，包括國家生物資訊中心(Bethesda, MD)，以及於網路上，供用於關於數個序列分析程式。如何使用此程式來決定序列同一性的說明可於網路在BLAST的“輔助程式”節得到。關於核酸序列的比較，BLAST(Blastn)程式之“Blast 2序列”功能可以利用系統內定的參數來使用。當以此方法來評定時，具有關於參考序列還更大的相似性之核酸序列將顯示出增高的同一性百分比。

[0049]可操縱地鏈接：當第一個的核酸序列與第二個的核酸序列處於功能性的關係的場合，第一個核酸序列可操

縱地鏈接第二個核酸序列。舉例說，當一個啓動子影響一編碼序列的轉錄或表現時，該啓動子可操縱地鏈接該編碼序列。當重組生產時，可操縱地鏈接的核酸序列一般爲連續的以及，必需時要使二個蛋白質編碼區域結合，於相同的閱讀框架內。然而，要可操縱地鏈接的單元不需要爲連續的。

[0050]啓動子：一種DNA區域，其通常座落於需要轉錄的區域之上游(朝一基因的5'區域)。啓動子可允許其等控制的基因之適當的活化或抑制。一啓動子可含有轉錄因子所辨認之特定的序列。此等因子可結合至啓動子DNA序列且導致RNA聚合酶的補充，RNA聚合酶爲由基因之編碼區域來合成RNA之酵素。

[0051]轉形：當一核酸分子變成爲由一細胞穩定地複製時，不論是藉由該核酸分子併入至細胞基因組之內或是藉由游離基因組(episomal)複製，則該細胞係由該轉導至細胞內的核酸分子所“轉形”。當使用於本文中，術語“轉形”包含可以導入一種核酸分子至此一細胞之內的所有技術。實例包括，但不限於：用病毒載體轉染；用質體載體轉形；電穿孔(Fromm等人(1986) Nature 319:791-3)；脂轉染(lipofection)(Felgner等人(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7)；顯微注射(Mueller等人(1978) Cell 15:579-85)；農桿菌(*Agrobacterium*)媒介之轉移(Fraley等人(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7)；直接DNA攝入；晶鬚媒介之轉形；以及基因槍法(microprojectile bombardment)(Klein

等人(1987) Nature 327:70)。

[0052]轉基因：一種外源性核酸序列。於一實例中，一個轉基因爲一基因序列(舉例而言，一個除草劑抗性基因)、編碼工業上或是藥學上有用的化合物之基因，或是編碼所欲的農業性狀之基因。於再另一實例中，轉基因爲一個反義核酸序列，其中反義核酸序列的表現抑制一標靶核酸序列的表現。一個轉基因可以含有可操縱地連結至該轉基因之調節序列(舉例而言，一個啓動子)。於一些具體例中，一個感興趣的核酸序列爲一個轉基因。然而，於其他的具體例中，一個感興趣的多核苷酸序列爲一個內源的核酸序列，其中內源性核酸序列之額外的基因組複本爲所欲的，或是一個多核苷酸序列，其係處於相對於宿主生物內之標靶核酸分子的序列爲反義方向的。

[0053]基因轉殖品件(Transgenic Event)：一基因轉殖“品件”之產生係藉由以異源性DNA，亦即，一包括一感興趣的轉基因的核酸建構物，來轉形植物細胞、再生一起因於插入該轉基因至植物的基因組內的植物的族群，以及選擇特徵在於插入至一特定的基因組位置內之特定的植物。術語“品件”意指包括該異源性DNA的原始轉形體和該轉形體的後代。術語“品件”亦意指由在該轉形體和另一個包括該基因組的/轉基因DNA的品種(variety)之間的有性遠系雜交 (sexual outcross)所產生的後代。甚至在重複回交 (back-crossing)至一輪迴親代(recurrent parent)之後，來自該被轉形的親代之被插入的轉基因DNA和毗鄰基因組

DNA(基因組的/轉基因DNA)於該雜交的後代中、在相同的染色體位置是存在的。術語“品件”亦意指由於一包含該被插入的DNA[例如，該原始轉形體和起因於自花授粉(selfing)的後代]的親代品系和一不含有該被插入的DNA的親代品系的一有性雜交，來自原始轉形體和它的後代的DNA，其包含有該被插入的DNA及立即鄰接被插入的DNA的毗鄰基因組序列，其被預期要被轉移至一接受包括該感興趣的轉基因之被插入的DNA之後代。

[0054]載體：一種核酸分子，當其導入至一細胞之內時，由此生產轉形的細胞。一載體可以包括准許其於宿主細胞內複製之核酸序列，例如複製起點。實例包括，但不限於，攜帶外源性DNA至一細胞之內的質體、黏接質體(cosmid)、噬菌體，或是病毒。實例包括，但是不限於，一載體也可以包括一個或多個基因、反義分子，及/或可選標記基因以及本技藝已知的其他遺傳單元。一載體可以轉導、轉形，或感染一細胞，藉此造成細胞表現該載體編碼的核酸分子及/或蛋白質。一載體可以選擇性地包括協助完成該核酸分子進入細胞的材料(舉例而言，脂質體、蛋白質編碼(protein coding)等等)。

[0055]除非另有明確說明，本文中使用的所有技術和科學的術語具有如同此揭示所屬技藝之熟悉此藝者普遍瞭解的相同意義。分子生物學中共同術語的定義可以於以下找到，舉例而言：Lewin, Genes V, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9)；Kendrew 等人 (eds.), *The*

Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)；以及Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。

[0056]當使用於本文中，冠詞，“一個(a)”、“一個(an)”，以及“該(the)”包括複數的參考，除非上下文另有清楚且不含糊地指定。

IV. 合成雙向啓動子，*RUbi3*，及包含其之核酸

[0057]本揭示提供包含一種合成核苷酸序列的核酸分子，該合成核苷酸序列可以作用爲雙向啓動子。於一些具體例中，一種合成雙向啓動子可以可操縱地鏈接至感興趣的1個或2個核苷酸序列。舉例而言，該合成稻米泛素3雙向啓動子可以可操縱地鏈接至感興趣的1個或2個多核苷酸序列(舉例而言，二個基因，一者於啓動子的各端上)，以便調節感興趣的核苷酸序列之至少一者(舉例而言，一者或兩者)的轉錄。於一些具體例中，藉由併入來自稻米泛素3啓動子的URS於該合成稻米泛素3雙向啓動子內，有關於可操縱地鏈接至該合成稻米泛素3雙向啓動子之感興趣的多核苷酸序列之特定的表現和調節模式可以完成(舉例而言，例如透過在稻米泛素3啓動子的控制之下的基因來展現)。

[0058]本發明的一些具體例係於本文中舉例說明，其係透過併入一種來自雙向的玉米泛素-1基因(*ZmUbi1*)啓動子之最小核心啓動子單元至不同於天然的啓動子的環境之分子環境之內來建造一種合成雙向啓動子。此最小核心啓動

子單元於本文係提及為“minUbi1P”，以及大概為200 nt長度。來自多種玉蜀黍(*Zeas*)物種和玉蜀黍(*Z. mays*)基因型之minUbi1P元素的定序和分析已經顯露出功能性的minUbi1P元素為高度守恆的，以使得一種minUbi1P元素可以元保留其作為轉錄起始子的作用，設若其與序列辨識編號：2的minUbi1P元素共享有，舉例而言，至少大約75%、至少大約80%、至少大約85%、至少大約90%、至少大約91%、至少大約92%、至少大約93%、至少大約94%、至少大約95%、至少大約96%、至少大約97%、至少大約98%、至少大約99%，及/或至少大約100%的序列同一性。於本發明的一些具體例中可能有用的minUbi1P元素的特徵可以包括，舉例而言且不限於，前述的核苷酸序列之高守恆性，存在至少一個TATA盒，及/或存在至少一個(舉例而言，二個)熱休克一致單元。於特定的minUbi1P元素內，超過一種熱休克一致元素可以重疊於minUbi1P序列之內。

[0059]於具體例中，併入一種minUbi1P元素至不同於天然的啟動子(亦即，稻米泛素3)的環境之分子環境之內來建造一種合成雙向啟動子的方法，可以包含併入該minUbi1P元素至稻米泛素3啟動子核酸，同時使該minUbi1P元素相關於該稻米泛素3啟動子之其餘的序列，之方位反轉。因而，一種合成稻米泛素3雙向啟動子可以包含一種坐落於一稻米泛素3啟動子核苷酸序列的3'處，且處於相關於稻米泛素3啟動子核苷酸序列反向的方位，之minUbi1P最小核心啟動子元素，以使得其可以可操縱地鏈接至坐落於該稻米泛素3

啓動子核苷酸序列的3'處之感興趣的核苷酸序列。舉例而言，該minUbi1P元素可以以反向的方位併入至稻米泛素3啓動子之3'端。

[0060]一種合成雙向稻米泛素3啓動子除了天然稻米泛素3啓動子之minUbi1P元素之外，還可以包含一個或多個額外的序列元素。於一些具體例中，一種合成雙向稻米泛素3啓動子可以包含一個啓動子URS；一個外顯子(舉例而言，一個前導子或是訊息胜肽)；一個內含子；一個間隔子序列；及/或前述的任一者之一者或多者之組合。舉例而言且不限於，一種合成雙向稻米泛素3啓動子可以包含一種來自稻米泛素3或ZmUbi1啓動子的URS序列；一種來自稻米泛素3或ZmUbi1基因的內含子；編碼來自稻米泛素3或ZmUbi1基因的一種前導子胜肽之外顯子；一種來自稻米泛素3或ZmUbi1基因的內含子；以及此等之組合。

[0061]除了minUBi1P元素及含括minUbi1P之天然啓動子稻米泛素3之元素之外，一種合成雙向稻米泛素3啓動子還可以包含一個或多個額外的序列元素。於一些具體例中，一種合成雙向稻米泛素3啓動子可以包含一個啓動子URS；一個外顯子(舉例而言，一個前導子或是訊息胜肽)；一個內含子；一個間隔子序列；以及或是前述的任一者之一者或多者之組合。舉例而言且不限於，一種合成雙向稻米泛素3啓動子可以包含一種來自玉蜀黍(*Zea mays*)泛素1啓動子的URS序列；一種來自ADH基因的內含子；編碼來自玉蜀黍(*Zea mays*)泛素基因的一種前導子胜肽之外顯

子；一種來自玉蜀黍(*Zea mays*)泛素基因的內含子；以及此等之組合。

[0062]於一種包含一種啟動子URS之啟動子的一些具體例中，該URS可以予以選擇以賦予該合成啟動子特定的調節特質。已知的啟動子於運用其等之可操縱地鏈接的基因之控制的類型上廣泛地變化(舉例而言，環境的反應、發育的提示，和空間資訊)，以及併入至一種異源性啟動子內的URS相關於其之天然的啟動子和可操縱地鏈接的基因，典型地維持URS展現出控制的類型。Langridge等人(1989)，在前。業已特徵化且可以含有依據一些具體例的合成雙向稻米泛素3啟動子之內所含的URS之真核啟動子的實例，包括舉例而言且不限於：於美國專利號碼6,437,217(玉米(maize)RS81啟動子)；5,641,876(稻米的肌動蛋白啟動子)；6,426,446(玉米(maize)RS324啟動子)；6,429,362(玉米(maize)PR-1啟動子)；6,232,526(玉米(maize)A3啟動子)；6,177,611(組成玉米(maize)啟動子)；6,433,252(玉米(maize)L3油體膜蛋白(oleosin)啟動子)；6,429,357(稻米的肌動蛋白2啟動子，及稻米的肌動蛋白2內含子)；5,837,848(根特異性啟動子)；6,294,714(光可誘導的啟動子)；6,140,078(鹽可誘導的啟動子)；6,252,138(病原體可誘導的啟動子)；6,175,060(缺磷症可誘導的啟動子)；6,388,170(雙向啟動子)；6,635,806(γ -醇溶蛋白(coixin)啟動子；以及美國專利申請案序號09/757,089(玉米(maize)葉綠體醛醇酶啟動子)之內描述的該等啟動子。

[0063]額外的例示性原核啓動子包括胭脂鹼(nopaline)合成酶(NOS)啓動子(Ebert等人(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16):5745-9)；章魚肉鹼合成酶(OCS)啓動子(其係攜帶於根瘤農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的腫瘤誘生型質體之上)；花椰菜嵌紋病毒(caulimovirus)啓動子，例如花椰菜嵌紋病毒(cauliflower mosaic virus) (CaMV)19S啓動子(Lawton等人(1987) Plant Mol. Biol. 9:315-24)；CaMV 35S啓動子(Odell等人(1985) Nature 313:810-2)；玄參嵌紋病毒(figwort mosaic virus)35S啓動子(Walker等人(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(19):6624-8)；蔗糖合成酶啓動子(Yang and Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144-8)；R基因複合體啓動子(Chandler等人(1989) Plant Cell 1:1175-83)；CaMV35S(美國專利號碼5,322,938、5,352,605、5,359,142，以及5,530,196)；FMV35S(美國專利號碼6,051,753，以及5,378,619)；PC1SV啓動子(美國專利號碼5,850,019)；SCP1啓動子(美國專利號碼6,677,503)；以及農桿腫瘤菌(*Agrobacterium tumefaciens*)Nos啓動子(GenBank存取號碼V00087；Depicker等人(1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:561-73；Bevan等人(1983) Nature 304:184-7)，以及類似物。

[0064]於一些具體例中，一種合成稻米泛素3雙向啓動子可以進一步包含一外顯子。舉例而言，可能希望靶定或是運輸一種多肽至特定的亞細胞位置及/或隔室，該多肽係由可操縱地鏈接至該啓動子之感興趣的多核苷酸序列所編

碼的。於此等與其他的具體例中，一編碼序列(外顯子)可以併入至一個核酸分子內，該核酸分子係介於其餘的合成稻米泛素3雙向啓動子序列和編碼一種多肽的核苷酸序列之間。此等元素可以依據熟練的從事者之判斷力來配置以使得合成稻米泛素3雙向啓動子促進一種多肽(或是可操縱地鏈接至該啓動子之二個多肽編碼序列之一者或兩者)的表現，該多肽包含由併入的編碼序列所編碼的胜肽，以與該多肽的剩餘部分功能性的關係。於特定實例中，可以併入一種編碼一個前導子、運輸子(transit)，或是訊息胜肽(舉例而言，玉蜀黍(*Zea mays*)Ubi1前導子胜肽)的外顯子。

[0065]可以由併入至合成稻米泛素3雙向啓動子之內的一種外顯子所編碼之胜肽包括，舉例而言且不限於：泛素(舉例而言，玉蜀黍(*Zea mays*)Ubi1)前導子胜肽，葉綠體運送胜肽(CTP) (舉例而言，阿拉伯芥(*A. thaliana*)EPSPS CTP (Klee等人(1987) Mol. Gen. Genet. 210:437-42)，以及矮牽牛(*Petunia hybrida*)EPSPS CTP (della-Cioppa等人(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6873-7))，如同於國際PCT公開案號碼 WO 2008/105890內舉例說明的葉綠體靶定之汰克草(dicamba)單氧化酶(DMO)。

[0066]於本發明的一些具體例中，內含子也可以併入至一種合成稻米泛素3雙向啓動子之內，舉例而言，在介於其餘的合成稻米泛素3雙向啓動子序列和可操縱地鏈接至該啓動子之感興趣的核苷酸序列之間。於一些實例中，一種併入至一種合成稻米泛素3雙向啓動子之內的内含子可以

是，不限於，一種作用為一轉譯前導子序列之5'UTR，其出現於轉譯開始序列之完全加工的mRNA上游(此一轉譯前導子序列可以影響一種原始的轉錄本加工成mRNA、mRNA穩定性，及/或轉譯效率)。轉譯前導子序列之實例包括玉米(maize)和牽牛花熱休克蛋白前導子(美國專利第5,362,865號)、植物病毒外殼蛋白前導子、植物核酮糖雙磷酸羧化酶(rubisco)前導子，以及其他。見，舉例而言，Turner and Foster (1995) Molecular Biotech. 3(3):225-36。5'UTRs之非限制性實例包括GmHsp(美國專利第5,659,122號)、PhDnaK(美國專利第5,362,865號)、AtAnt1、TEV (Carrington and Freed (1990) J. Virol. 64:1590-7)，以及AGRtunos(GenBank存取號碼V00087；以及Bevan等人(1983) Nature 304:184-7)。於特定的實例中，一種玉蜀黍(*Zea mays*)泛素1內含子可以併入至一種合成稻米泛素-3雙向啟動子之內。

[0067]可以選擇性併入至一種合成稻米泛素-3雙向啟動子之內的額外序列包括，舉例而言且不限於：3'非轉譯序列、3'轉錄終止區，以及聚腺苷酸化的區域。此等為坐落於一種感興趣的多核苷酸序列的下游之遺傳元素(舉例而言，可操縱地鏈接至一種合成稻米泛素-3雙向啟動子之感興趣的序列)，以及包括多核苷酸，其提供聚腺苷酸化訊息，及/或能夠影響轉錄、mRNA加工，或是基因表現之其他的調節訊息。一種聚腺苷酸化訊息可以作用於植物內而導致聚腺苷酸核苷酸添加至mRNA前驅物的3'端。聚腺苷酸化序列可以衍生自天然的基因、衍生自各種各樣的植物基

因，或是衍生自T-DNA基因。一種3'轉錄終止區之非限制性實例為胭脂鹼合成酶3'區域(nos 3'；Fraley等人(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7)。Ingelbrecht等人之(1989)，Plant Cell 1:671-80之內，提供不同的3'非轉譯區之使用的實例。聚腺苷酸化訊息之非限制性實例包括來自豌豆(*Pisum sativum*)RbcS2基因之一者(Ps.RbcS2-E9；Coruzzi等人(1984) EMBO J. 3:1671-9)以及農桿腫瘤菌(*Agrobacterium tumefaciens*)Nos基因(GenBank存取號碼E01312)。

[0068]於一些具體例中，一種合成稻米泛素-3雙向啟動子包含一個或多個核苷酸序列，其促進一種包含啟動子的核酸靶定至一標靶有機體的基因組內之特定的基因座。舉例而言，可以含括與宿主內的基因組DNA序列區段同源的一個或多個序列(舉例而言，稀有的或獨特的基因組DNA序列)。於一些實例中，此等同源序列可以引導一種包含合成稻米泛素-3雙向啟動子的核酸，在宿主基因組內之同源的DNA之處的重組和整合。於特定實例中，一種合成稻米泛素-3雙向啟動子包含促進一種含有啟動子的核酸靶定至宿主基因組內之稀有的或獨特的位置處的一個或多個核苷酸序列，其利用建造的核酸酶酵素，該核酸酶酵素識別位於稀有的或獨特的位置處之序列且促進位於稀有的或獨特的位置處之整合。此一使用鋅指核酸內切酶作為核酸酶酵素之靶定整合系統係描述於美國專利申請案13/011,735之內，其全體內容係在此併入以作為參考資料。

[0069]於其他的具體例中，本揭示進一步含括包含一性狀之該感興趣的多核苷酸序列作為一具體例。該性狀可以為一種殺蟲抗性性狀、除草劑耐受性性狀、氮利用效率性狀、水利用效率性狀、營養品質性狀、DNA結合性狀、可選標記，以及其等之任一組合。

[0070]在進一步的具體例中，該等性狀被整合至基因轉殖植物細胞中作為基因轉殖品件。在額外的具體例中，該基因轉殖品件生產一商品產物。於是，一種組成物係衍生自本揭示之基因轉殖植物細胞，其中該組成物為選自於以下所組成之群組的商品產物：膳食、麵粉、蛋白質濃縮物，或油。在進一步的具體例中，含括由該基因轉殖植物細胞衍生的基因轉殖植物所生產的商品產物，其中該商品產物含有可檢測數量的本發明之核酸序列。在一些具體例中，此種商品產物可能舉例而言，藉由獲得基因轉殖植物並從該者製備食物或飼料來製造。包含本發明之一種或多種核酸序列之商品產物包括，舉例而言且不限於：一種植物之膳食、油、粉碎或全穀物或種子，及包含一重組植物或種子的任何膳食、油或粉碎或是全穀物的任何食品產物，其中該重組植物或種子含有本發明之一種或多種核酸序列。在一種或多種商品或商品產物中偵測本發明之一種或多種序列係為一事實上的證據，該者表明該商品或是商品產物係產自於設計來表現一種或多種農藝的性狀之的基因轉殖植物。

[0071]包含一種合成稻米泛素-3雙向啟動子的核酸可

以使用本技藝已知的任何技術來生產，包括舉例而言且不限於：RCA；PCR擴增；RT-PCR擴增；OLA；以及SNuPE。此等和其他等效的技術為熟悉此藝者熟知的，以及於下列中進一步詳細地描述，舉例而言且不限於：Sambrook等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 2001；以及Ausubel等人，*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1998。以上列舉的全部參考文獻，包括前述的手冊兩者，係以其等之全體併入於此以作為此參考資料，包括其內所提供之任何的圖示、圖，及/或表格。

V. 遞送包含合成雙向啟動子，*Rubi3*，之核酸分子至細胞

[0072]本揭示亦提供用一種包含合成稻米泛素-3雙向啟動子之核酸分子轉形細胞的方法。可以使用本技藝已知的導入核酸分子至植物內的許多技術之任一者，來用包含如一些具體例的一種合成稻米泛素-3雙向啟動子之核酸分子來轉形植物，舉例而言，以導入一種或更多種合成稻米泛素-3雙向啟動子至宿主植物基因體之內，及/或進一步導入可操縱地鏈接至該啟動子之感興趣的一種或更多種多核苷酸。

[0073]適合用於植物轉形的方法包括可以導入DNA至一細胞之內的任何方法，舉例而言且不限於：電穿孔法（見，舉例而言，美國專利 5,384,253）；基因槍法（microprojectile bombardment）（見，舉例而言，美國專利 5,015,580、5,550,318、5,538,880、6,160,208、6,399,861，

以及6,403,865)；農桿菌屬媒介的轉形(見，舉例而言，美國專利5,635,055、5,824,877、5,591,616；5,981,840，及6,384,301)；以及原生質體(protoplast)轉形(見，舉例而言，美國專利5,508,184)。透過應用例如前述的技術，可以穩定地轉形幾乎任何的植物物種之細胞，以及此等細胞藉由熟悉此藝者已知的技術可以發展成為基因轉殖植物。舉例而言，於棉花轉形的場合特別有用的技術係描述於美國專利5,846,797、5,159,135、5,004,863，以及6,624,344之內；用於轉形藝薹屬(*Brassica*)植物的技術特別地說明於，舉例而言，美國專利5,750,871之內；用於轉形大豆的技術係說明於，舉例而言，美國專利6,384,301之內；以及用於轉形玉米(maize)的技術係說明於，舉例而言，美國專利7,060,876和5,591,616，以及國際PCT公開案WO 95/06722之內。

[0074]在達到遞送一種外源性的核酸至接受細胞(recipient cell)之後，經轉形的細胞一般予以鑑定用於進一步培養和植物再生。為了改善鑑定轉形體的能力，可能希望使用一種可選或可篩選標記基因加上用來產生轉形體之轉形載體。於此事例內，可能轉形的細胞族群可以藉由使細胞暴露於一種選擇劑或多種選擇劑來分析，或是細胞可以篩選所欲的標記基因性狀。

[0075]在暴露於選擇劑之後仍然生存的細胞，或是於篩選分析中已經評分為陽性的細胞，可以培養於支持植物的再生之培養基內。於一些具體例中，任何適合的植物組織培養基(舉例而言，MS和N6培養基)可以透過含括另外的物

質，例如生長調節劑，而改良。組織可以維持於帶有生長調節劑的基礎培養基上，直到可得到足夠的組織來開始植物再生努力為止，或是跟隨重複循環的手工選擇，直到組織的形態適合再生為止(舉例而言，至少2週)，接而轉移至有助於莖(shoot)形成的培養基。週期性地轉移培養物直到足夠的莖形成已出現為止。一旦莖形成，將其等轉移至有助於根形成的培養基。一旦形成足夠的根，植物可以轉移至土壤用於進一步的生長和成熟。

[0076]爲了確認再生的植物內包含一種合成稻米泛素-3雙向啟動子之所欲的核酸分子之存在，可以執行各種各樣的分析。此等分析包括，舉例而言：分子生物分析，例如南方墨點和北方墨點以及PCR；生化分析，例如，舉例而言，透過免疫學的手段(ELISA及/或西方墨點)或是透過酵素功能來偵測蛋白質產物的存在；植物部分的分析，例如葉子或根的分析；以及全株再生植物之表現型的分析。

[0077]靶定整合的品件可以，例如，透過舉例而言，使用對於感興趣的核酸分子特異的寡核苷酸引子之PCR擴增來篩選。瞭解到PCR基因型分型包括，但不限於，由預料會含有一種整合至基因組之內的感興趣的核酸分子之經單離的宿主植物癒合組織，衍生的基因組DNA之聚合酶連鎖反應(PCR)予以擴增，接著標準的PCR擴增產物之選殖和序列分析。PCR基因型分型的方法已經充分地描述(見，舉例而言，Rios等人(2002)，Plant J. 32:243-53)，以及可以應用至衍生自任何的植物物種或是組織類型，包括細胞培養

物，的基因組DNA。結合至靶定序列和導入的序列兩者之寡核苷酸引子的組合可以連續地或是多工的使用於PCR擴增反應中。可以生產設計成要黏著(anneal)靶定位址、導入的核酸序列，及/或二者之組合的寡核苷酸引子。因而，PCR基因型分型策略可以包括，舉例而言且不限於：於植物基因組內之特異的序列之擴增；於植物基因組內之多重特定的序列之擴增；於植物基因組內之非特異的序列之擴增；以及前述的任一者之組合。熟悉此藝者可以設計額外的引子組合和擴增反應來訊問基因組。舉例而言，可以設計一組順向和反向寡核苷酸引子來黏著對於導入的核酸序列的邊界之外的標靶特異的核酸序列。

[0078]順向和反向寡核苷酸引子可以設計成要特異性地黏著一個導入的核酸分子，舉例而言，在對應於其內所包含的感興趣的多核苷酸序列之內的編碼區域之序列處，或是該核酸分子之其他部分。此等引子可以結合以上說明的引子來使用。寡核苷酸引子可以依據所欲的序列予以合成，以及為商業上可得到的(舉例而言，從Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA)。擴增可以接著選殖和定序，或是直接的序列分析擴增的產物。熟悉此藝者可以於PCR基因型分型的整個期間，展望任擇的方法以分析所產生的擴增產物。於一具體例中，對於基因標靶特異的寡核苷酸引子係使用於PCR擴增。

VI. 包含合成雙向啟動子，*RUBi3*，之細胞、細胞培養物、組織及生物體

[0079] 本發明的一些具體例亦提供包含一種合成稻米泛素-3雙向啓動子的細胞，舉例而言，如同可以出現於一核酸建構物內。於特定實例中，依據一些具體例之一種合成稻米泛素-3雙向啓動子可以利用作為調節序列來調節植物細胞和植物之內轉基因的表現。於一些此等實例中，一種可操縱地鏈接至感興趣的多核苷酸序列(舉例而言，1個轉基因)之合成雙向RUBi3啓動子的使用，可以減少調節已知數量的感興趣的多核苷酸序列之表現所需要的同源啓動子數量，及/或降低導入已知數量的感興趣的核苷酸序列所需要的該(等)核酸建構物之尺寸。再者，一種合成稻米泛素-3雙向啓動子之使用可以允許感興趣的2個可操縱地鏈接的核苷酸序列於相同的條件下共表現(亦即，於RUBi3啓動子為活性的條件下)。此等實例可以是特別地有用的，舉例而言，在感興趣的2個可操縱地鏈接的核苷酸序列於一種包含感興趣的核苷酸序列之基因轉殖宿主內各自貢獻一單一的性狀時，以及感興趣的核苷酸序列之共表現有利地衝擊基因轉殖宿主內之性狀表現時。

[0080] 於一些具體例中，一種包含一個或更多個合成稻米泛素-3雙向啓動子及/或感興趣的核苷酸序列之基因轉殖植物可以具有一個或多個所欲的性狀，該性狀係透過表現感興趣的核苷酸序列於植物內而賦予(舉例而言，導入、增強，或是貢獻)。此等性狀可以包括，舉例而言且不限於：對昆蟲、其他的害蟲，和致病劑(disease-causing agents)之抗性；除草劑耐受性；增強的穩定性、產量，或是儲放壽

命；環境耐受性；藥學上的生產；工業的產物生產；以及營養增強。於一些實例中，一種所欲的性狀可以透過用一種核酸分子來轉形植物而賦予，該核酸分子包含一種可操縱地鏈接至1個感興趣的多核苷酸序列之合成稻米泛素-3雙向啟動子。於一些實例中，一種所欲的性狀可以賦予給經由育種而生產為後代植物之植物，該性狀可以透過可操縱地鏈接至一種合成稻米泛素-3雙向啟動子之一個或更多個感興趣的核苷酸序列而賦予，該一個或更多個感興趣的核苷酸序列係由包含可操縱地鏈接至一種合成稻米泛素-3雙向啟動子之感興趣的核苷酸序列之親代植物而傳遞給植物。

[0081]一種如一些具體例之基因轉殖植物可以為能夠用本發明的一種核酸分子予以轉形的任何植物，或是用本發明的一種核酸分子予以轉形的一種植物來培育的任何植物。於是，該植物可以為一種雙子葉植物或單子葉植物。供使用於一些實例中之雙子葉植物的非限制性實例包括：苜蓿；豆；青花菜；甘藍菜；油菜；胡蘿蔔；花椰菜；芹菜；山東白菜；棉花；胡瓜；茄子；萵苣；甜瓜；豌豆；胡椒；花生；馬鈴薯；南瓜(pumpkin)；蘿蔔；油菜子；菠菜；大豆；南瓜(squash)；甜菜；葵花；菸草；番茄；以及西瓜。供使用於一些實例中之單子葉植物之非限制性實例包括：短柄草屬(*Brachypodium*)；玉米(corn)；洋蔥；稻米；高粱；小麥；黑麥；粟；甘蔗；燕麥；黑小麥；柳枝稷(switchgrass)；以及草坪草(turfgrass)。

[0082]於一些具體例中，一種基因轉殖植物可以以任何方式使用或是栽培，其中存在一種合成稻米泛素-3雙向啟動子及/或可操縱地鏈接至感興趣的多核苷酸序列為令人滿意的。於是，此等基因轉殖植物可以藉由用依據本發明的核酸分子來轉形而建造成，尤其，具有一個或多個所欲的性狀或基因轉殖品件，以及可以透過熟悉此藝者已知的任何方法來種植或栽培。

[0083]提供下列實施例以闡明某些特定的特徵及/或具體例。實施例不應被理解為限制舉例說明的特定的特徵或是具體例之揭示。

實施例

實施例1：雙向啟動子之設計

[0084]設計一種含有來自玉蜀黍 (*Zea mays*) 泛素1(ZmUbi1)及稻米泛素3(Rubi3)啟動子之基因調節元素的雙向啟動子，以及呈現如同序列辨識編號：1。此雙向啟動子含有以反向互補的方位融合至全長Rubi3啟動子(鹼基對1,314-3,303；序列辨識編號：9)之5'端之部分ZmUbi1啟動子(鹼基對1-1,313；序列辨識編號：8)。部分ZmUbi1啟動子之組分含有ZmUbi1最小核心啟動子之215 bp區域(加底線字型於鹼基對1,099-1,313；序列辨識編號：2)，ZmUbi1 5'非轉譯區域(粗體字型於鹼基對1,016-1,097；序列辨識編號：3)，以及ZmUbi1內含子(小寫字型於鹼基對1-1,015，序列辨識編號：4)。全長Rubi3啟動子之組分含有上游及核心啟動子區域(斜體字型於鹼基對1,314-2,096；序列辨識編號：5)。

號：7)、稻米Ubi3 5'非轉譯區域(粗體且加底線字型於鹼基對2,097-2,163；序列辨識編號：5)，以及稻米Ubi3內含子(加底線及小寫字型於鹼基對2,164-3,303；序列辨識編號：6)。
序列辨識編號：1：

tgcagaagtaacaccaaacaacagggtgagcatcgacaaaagaaacagtacc
aagcaaataaatagcgtatgaaggcagggtctaaaaaatccacatatagctgct
gcatatgccatcatccaagtatatcaagatcgaaataattataaaacatacttgttt
attataatagataggtactcaagggttagagcatatgaatagatgctgcatatgcc
tcatgtatatgcatcagtaaaacccacatcaacatgtatacctatcctagatcgat
attccatccatcttaaactcgtactatgaagatgtatgacacacacatacagttc
caaaattaataataacaccaggtagtttgaaacagtattctactccgatctagaac
gaatgaacgaccgccaaccacaccacatcatcacaaccaagcgaacaaaaa
gcatctctgtatatgcatcagtaaaacccgcatcaacatgtatacctatcctagat
cgatatttccatccatcatcttcaattcgtaactatgaatatgtatggcacacacat
acagatccaaaattaataaatccaccaggtagtttgaaacagaattctactccgat
ctagaacgaccgccaaccagaccacatcatcacaaccaagacaaaaaaaag
catgaaaagatgaccgacaaacaagtgcacggcatatattgaaataaaggaa
aaggggcaaaccaaaccctatgcaacgaaacaaaaaaaatcatgaaatcgatcc
cgtctgcggaacggctagagccatcccaggattcccaaagagaaacactgg
caagttagcaatcagaacgtgtctgacgtacaggtcgcacccgtgtacgaacgc
tagcagcacggatctaacacaaacacggatctaacacaaacatgaacagaagt
agaactaccggggccctaacctatgcatggaccggaacgccgatctagagaagg
tagagagggggggggggggggggaggacgagcggcggtac**CTTGAAGC**
GGAGGTGCCGACGGGTGGATTTGGGGGGAGATC

TGGTTGTGTGTGTGTGCGCTCCGAACAACACGA
GGTTGGGGAAAGAGGGTGTGGAGGGGGGTGTCTAT
TTATTACGGCGGGCGAGGAAGGGAAAGCGAAGGA
GCGGTGGGAAAGGAATCCCCCGTAGCTGCCGGTGC
CGTGAGAGGAGGAGGAGGCCGCCTGCCGTGCCGG
CTCACGTCTGCCGCTCCGCCACGCAATTTCTGGATG
CCGACAGCGGAGCAAGTCCAACGGTGGAGCGGAA
CTCTCGAGAGGGGTCCAGGATGTGAAGAACAGGTAA
ATCACGCAGAAGAACCCATCTCTGATAGCAGCTATCGA
TTAGAACAACGAATCCATATTGGGTCCGTGGGAAATAC
TACTGCACAGGAAGGGGGCGATCTGACGAGGCCCC
GCCACCGGCCTCGACCCGAGGCCGAGGCCGACGAA
GCGCCGGCGAGTACGGCGCCGCGGCGGCCTCTGCC
CGTGCCCTCTGCGCGTGGGAGGGAGAGGCCGCGGT
GGTGGGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCAGCTGGT
GCGGCGGCGCGGGGGGTCAGCCGCCGAGCCGGCGG
CGACGGAGGAGCAGGGCGGCGTGGACGCGAACTTC
CGATCGGTTGGTCAGAGTGCGCGAGTTGGGCTTAGC
CAATTAGGTCTCAACAATCTATTGGGCCGTAAAATTCA
TGGGCCCTGGTTTGTCTAGGCCCAATATCCCGTTCATT
TCAGCCCACAAATATTTCCCCAGAGGATTATTAAGGCC
CACACGCAGCTTATAGCAGATCAAGTACGATGTTTCCT
GATCGTTGGATCGGAAACGTACGGTCTTGATCAGGCA
TGCCGACTTCGTCAAAGAGAGGGCGGCATGACCTGAC



GCGGAGTTGGTTCCGGGCACCGTCTGGATGGTCGTA
CCGGGACCGGACACGTGTCGCGCCTCCAACACTACATG
GACACGTGTGGTGCTGCCATTGGGCCGTACGCGTGG
CGGTGACCGCACCGGATGCTGCCTCGCACCGCCTTG
CCCACGCTTTATATAGAGAGGTTTTCTCTCCATTAATCG
CATAGCGAGTCGAATCGACCGAAGGGGAGGGG
GAGCGAAGCTTTGCGTTCTCTAATCGCCTCGTC
AAGgtaactaatcaatcacctcgtcctaatcctcgaatctctcgtggtgccg
ctaatctcgcgattttgatgctcgtggtggaaagcgtaggaggatcccgcgga
gttagtctcaatctctcagggtttcgtgcgattttagggtgatccacctttaatcg
agttacggtttcgtgcgattttagggtaatcctcttaatctctcattgattagggttt
cgtgagaatcgaggtagggatctgtgttatttatatcgatctaatagatggattgg
tttgagattgttctgtcagatggggattgttcgatatattaccctaataatgatgtgtc
agatggggattgttcgatatattaccctaataatgatgtgtcagatggggattgttcg
atatattaccctaataatgatggataataagagtagttcacagttatgtttgatcctgcc
acatagtttgagttttgtgatcagatttagtttcacttatttgtgcttagttcggatgg
gattgttctgatattgttccaatagatgaatagctcgttaggttaaaatcttttaggtt
gagttaggcgacacatagttttatttcctctggatttggattggaattgtgttcttagt
tttttccctggatttggattggaattgtgtggagctgggtagagaattacatct
gtatcgtgtacacctacttgaactgtagagcttgggttctaagggtcaatttaatctg
tattgtatctggctctttgcctagttgaactgtagtgctgatgttgtactgtgtttttt
accgttttatttgctttactcgtgcaaatcaaactctgtcagatgctagaactaggt
ggctttattctgtgttcttacatagatctgttgcctgtagttacttatgtcagttttgtt
attatctgaagatatttttggttgttgcctgttggatgtggtgtgagctgtgagcagcg

ctcttatgattaatgatgctgtccaattgtagtgtaatatgatgtgattgatatgttca
tctattttgagctgacagtaccgatatcgtaggatctgggtgccaacttattctccag
ctgctttttttacctatgtaattccaatcctttcttgccctcttcag

實施例2：植物轉形建構物

[0085]設計植物轉形建構物來測試雙向啓動子在植物界的表現。產生最終的雙向啓動子係透過插入一種玉蜀黍 (*Zea mays*) 泛素1最小啓動子，其係驅動一種上游報導基因，且反向互補於驅動第二種報導基因之原始的稻米泛素3啓動子之方位。二種雙元載體，pDAB113122(圖1；序列辨識編號：22)及pDAB113142(圖2；序列辨識編號：23)係被建造以包含新穎的序列辨識編號：1之雙向啓動子，其驅動 *Cry34Ab1* (Li H, Olson M, Lin G, Hey T, Tan SY, Narva KE (2013) *Bacillus thuringiensis* Cry34Ab1/Cry35Ab1 interactions with western corn rootworm midgut membrane binding sites. PLoS One 8: e53079)及 *Cry 35Ab1* (Li H, Olson M, Lin G, Hey T, Tan SY, Narva KE (2013) *Bacillus thuringiensis* Cry34Ab1/Cry35Ab1 interactions with western corn rootworm midgut membrane binding sites. PLoS One 8: e53079) 轉基因二者，以及以馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) StPinII 3' UTR終止(An等人，(1989) Plant Cell 1; 115-22)或是玉蜀黍 (*Zea mays*) Per5 3' UTR(美國專利第 6,699,984號)。所形成的建構物含有序列辨識編號：1之單一雙向啓動子，其驅動二種不同的轉基因，其等操縱地鏈

接至該雙向啓動子之5'與3'端。該建構物亦含有可選標記基因表現匣，其包含玉蜀黍 (*Zea mays*) 泛素1啓動子 (Christensen 等人，(1992) *Plant Molecular Biology* 18; 675-689)、*aad-1*基因(美國專利案第7,838,733號)，以及玉蜀黍 (*Zea mays*) 脂酶3'UTR(美國專利案第7,179,902號)。

實施例3：玉米(maize)轉形

[0086]使用以上所述之建構物來轉形玉米(maize)細胞。實驗建構物係經由農桿菌農桿菌(*Agrobacterium*)媒介的未成熟胚胎予以轉形，該未成熟胚胎係從自交品系，玉蜀黍 (*Zea mays*) c.v.B104單離。所使用的方法相似於Ishida等人出版的(1996) *Nature Biotechnol* 14:745–750及Frame等人(2006) *Plant Cell Rep* 25: 1024–1034中的該等方法，但是有幾處修飾和改良以使該方法可經得起高生產量轉形。用來生產一些玉米(maize)基因轉殖品件之方法實例係提供如下。

根瘤農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)之轉形

[0087]使雙元表現載體轉形至根瘤農桿菌菌株 DAt13192之內(RecA缺失三元(ternary) 菌株) (Int'l. Pat. Pub. No. WO2012016222)。選擇細菌菌落且單離雙元質體DNA以及經由限制酶消化來確認。

農桿菌培養的起始

[0088]將來自甘油存料之農桿菌屬培養物劃線於AB最少養分培養基(minimal medium)上以及在黑暗中、於20℃下

培育歷時3天。繼而將農桿菌屬培養物劃線於YEP培養基平盤上以及在黑暗中、於20°C下孵育歷時1天。

[0089]在實驗當天，於實驗中製備合適建構物數量的體積之接種培養基及乙醯丁香酮(acetosyringone)的混合物。將接種培養基移液至無菌、拋棄式250 mL燒瓶內。將配於100%二甲亞砜之1 M的乙醯丁香酮儲備溶液添加至含有接種培養基的燒瓶內成為最終乙醯丁香酮濃度200 μ M。

[0090]關於各個建構物方面，將來自YEP平盤之1-2個接種環的農桿菌懸浮在無菌、拋棄式50 mL離心管內的15 mL接種培養基/乙醯丁香酮混合物中，且用分光光度計來測量溶液於600 nm處的光密度(O.D.₆₀₀)。懸浮液繼而使用額外的接種培養基/乙醯丁香酮混合物，而稀釋減少至0.25至0.35的O.D.₆₀₀。繼而將農桿菌懸浮液的管子水平地放置在一平台搖動器上、設定在室溫下大約75 rpm歷時1至4小時之間然後使用。

穗滅菌及胚胎單離

[0091]在授粉後10至12天，從玉蜀黍(*Zea mays*)栽培種B104收穫穗。將收穫的穗去外皮且表面滅菌係藉由浸漬在20%的商業性的漂白水(ULTRA CLOROX® Germicidal Bleach，6.15%次氯酸鈉)及二滴TWEEN 20內，歷時20分鐘，接著在通風櫥中用無菌、去離子水沖洗三次。未成熟合子胚(1.8至2.2 mm長)係從每個穗無菌地剝離，且分配到一個或多個微量離心管中，該微量離心管含有2.0 mL的農

桿菌懸浮液，其業已添加2 µL的10% BREAK-THRU® S233 界面活性劑(Evonik Industries AG, Essen, Germany)。轉形係根據美國專利申請公開案第US 2013/0157369 A1號中所述的方法進行。

實施例4：分子確認

[0092]推定的基因轉殖玉米(maize)植物係於V2-3葉階段時取樣，使用*cry34Ab1*及*aad-1*定量PCR分析用於轉基因存在分析。使用MAGATTRACT® DNA萃取套組(Qiagen)、依照製造商的說明來從葉樣本萃取總DNA。

[0093]爲了偵測感興趣的基因，基因特異性DNA片段係用TAQMAN®引子/探針組來擴增，其含有用於*cry34Ab1*基因之FAM標記的螢光探針，以及用於內源性轉化酶參考基因對照之HEX標記的螢光探針。下列引子係用於*cry34Ab1*及轉化酶內源性參考基因擴增。引子序列如下：

*Cry34Ab1*引子/探針：

順向引子：TQ.8v6.1.F：GCCATACCCTCCAGTTG (序列辨識編號：10)

反向引子：TQ.8v6.1.R：GCCGTTGATGGAGTAGTAGATGG (序列辨識編號：11)

探針：TQ.8v6.1.MGB.P：5' /56 FAM/ CCGAATCCAA CGGCTTCA/MGB (序列辨識編號：12)

轉化酶引子：

順向引子：轉化酶F：TGGCGGACGACGACTTGT (序列辨

識編號：13)

反向引子：轉化酶R：AAAGTTTGGAGGCTGCCGT (序列

辨識編號：14)

轉化酶探針：5' /5HEX/CGAGCAGACCGCC GTGTACTT
/3BHQ_1/ 3' (序列辨識編號：15)

[0094]接著，PCR反應係在10 μ L反應終體積中進行，其含有5 μ l的Roche LIGHTCYCLER[®] 480 Probes Master Mix (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN)；0.4 μ l的每個TQ.8v6.1.F、TQ.8v6.1.R、轉化酶F及轉化酶R引子從10 μ M 存料至400 nM之最終濃度；0.4 μ l的每個TQ.8v6.1.MGB.P及轉化酶探針從5 μ M存料至200 nM之最終濃度，0.1 μ l的10%聚乙炔醇吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone) (PVP)至0.1%之最終濃度；2 μ l的10 ng/ μ l基因組DNA及0.5 μ l水。DNA係以Roche LIGHTCYCLER[®] 480系統、於下列條件下予以擴增：95°C之1個循環歷時10分鐘；下列3個步驟40個循環：95°C歷時10秒；58°C歷時35秒及72°C歷時1秒，以及4°C之最終循環歷時10秒。*Cry34Ab1*複本數係透過比較未知樣本之靶定(感興趣的基因)/參考(轉化酶基因)數值(LIGHTCYCLER[®] 480所輸出)和*cry34Ab1*複本數對照之靶定/參考數值來判定。此外，疏忽的雙元載體質體主幹之整合的污染係透過對存在於雙元載體主幹上的觀黴素(Spectinomycin)(Spec)抗性基因為特異性的水解探針分析來執行。

[0095] 偵測 *aad-1* 基因係如以上關於 *cry34Ab1* 基因所述、使用轉化酶內源性參考基因來執行。*aad-1* 的引子序列如下：

AAD1 順向引子：TGTTTCGGTTCCTCTACCAA (序列辨識編號：16)

AAD1 反向引子：CAACATCCATCACCTTGACTGA (序列辨識編號：17)

AAD1 探針：5'-FAM/CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA-MGB/BHQ-3' (序列辨識編號：18)

用來生產基因轉殖植物之雙元主幹中存在的 *spec* 基因之偵測，係用以下序列的引子來分析：

SPC1a：CTTAGCTGGATAACGCCAC (序列辨識編號：19)

SPC1s：GACCGTAAGGCTTGATGAA (序列辨識編號：20)

TQSPC(FAM 探針)：CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA (序列辨識編號：21)

[0096] 最後，8-12株含有感興趣的基因之 T_0 植物係於 V6 時取樣用於 Cry34Ab1、Cry35Ab1 及 AAD-1 葉子 ELISA 分析。從多個葉沖孔(leaf punches)取樣。葉子 Cry34Ab1(Agdia, Inc., Elkart, IN)、Cry35Ab1(Acadia BioScience)及 AAD-1(Agdia, Inc., Elkart, IN) ELISA 分析係依照製造商的說明來執行。葉子 ELISA 分析係表達為百萬分點(ppm，或 ng 蛋白

質/mg總植物蛋白質)。總蛋白質濃度係使用一種PIERCE 660™ nm蛋白質分析套組(Thermo Scientific; Rockford, IL)、遵照供應商的說明來決定。

實施例5：玉米(maize)中之轉基因表現

[0097]CRY34 ELISA結果表示Rubi3雙向啓動子(序列辨識編號：1)驅動用pDAB113122及pDAB113142建構物轉形的T₀品件中，Cry34Ab1及Cry35Ab1之表現。圖3與4顯示源自建構物pDA113122及pDAB113142之雙向啓動子的分析結果。數據顯露出於利用序列辨識編號：1之RUbi3雙向啓動子的玉米植物中，有一致的Cry34及Cry35蛋白質生產。建構物pDAB113122及pDAB113142二者中的Cry34(圖3，表1)、Cry35(圖4，表2)及AAD1(圖5，表3)之表現位準相似。數據顯示本發明所揭示的Rubi3雙向啓動子於製造由單一雙向啓動子元素共表現二種轉基因之基因轉殖性狀是有用的。

表1：源自建構物pDA113122及pDAB113142之Cry34蛋白質的平均表現

建構物	Cry34 (ng/mg)的平均表現
pDAB113122	112.38
pDAB113142	42.87647



表2：源自建構物pDA113122及pDAB113142之Cry35蛋白質的平均表現

建構物	Cry35 (ng/mg)的平均表現
pDAB113122	168.8
pDAB113142	187.4

表3：源自建構物pDA113122及pDAB113142之Cry35蛋白質的平均表現

建構物	AAD1 (ng/mg) 的平均表現
pDAB113122	339.0
pDAB113142	353.4

[0098]總而言之，設計一種新穎的序列辨識編號：1之RUbi3雙向啓動子且予以特徵化。首次揭露一種新穎的序列辨識編號：1之RUbi3雙向啓動子的調節元素供用於基因表現建構物。稻米泛素3及玉蜀黍(*Zea mays*)泛素1啓動子已經轉變成新穎的合成稻米泛素3雙向啓動子。該新穎的合成稻米泛素3雙向啓動子含有來自玉蜀黍(*Zea mays*)泛素-1啓動子及稻米泛素3啓動子之數個啓動子元素，其於雙子葉植物(例如，大豆)及單子葉植物(例如，玉米)二者中都是有功能的。從雙向啓動子獲得的第一及第二種感興趣的核苷酸之表現位準，似乎比得上單向啓動子基因建構物。雙向啓動子強壯地驅動融合至該雙向啓動子任一端的多重轉基因序列之表現。

[0099]儘管以上已經討論一些例示性的態樣和具體例，但熟悉此藝者會承認其之某些修飾、排列、加入以及次組合。因而下列附隨的請求項和此後導入的請求項意欲

解釋成包括全部的此等修飾、排列、加入以及次組合，如同於其等真實的精神和範疇之內。

【符號說明】

(無)

【序列表】

<110> 陶氏農業科學公司
<120> 合成雙向植物啓動子
<130> 75681
<160> 23
<170> PatentIn 版本 3.5
<210> 1
<211> 3303
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成稻米泛素-3 雙向多核苷酸啓動子

<400> 1	
tgcagaagta acaccaaaca acaggtgag catcgacaaa agaaacagta ccaagcaaat	60
aaatagcgtg tgaaggcagg gctaaaaaaaa tccacatata gctgctgcat atgccatcat	120
ccaagtatat caagatcgaa ataattataa aacatacttg ttattataa tagataggta	180
ctcaagggtt gagcataatga atagatgctg catatgccat catgtatatg catcagtaaa	240
accacatca acatgtatac ctatcctaga tcgatatttc catccatctt aaactcgtaa	300
ctatgaagat gtatgacaca cacatacagt tccaaaatta ataaatacac caggtagtgt	360
gaaacagtat tctactccga tctagaacga atgaacgacc gcccaaccac accacatcat	420
cacaaccaag cgaacaaaaa gcatctctgt atatgcatca gtaaaaccg catcaacatg	480
tatacctatc ctagatcgat atttccatcc atcatcttca attcgtaact atgaatatgt	540
atggcacaca catacagatc caaaattaat aaatccacca ggtagtttga aacagaattc	600
tactccgatc tagaacgacc gcccaaccag accacatcat cacaaccaag aaaaaaaaa	660
gcatgaaaag atgacccgac aaacaagtgc acggcatata ttgaaataaa ggaaaagggc	720
aaaccaaacc ctatgcaacg aaacaaaaaa aatcatgaaa tcgatcccgt ctgcggaacg	780
gctagagcca tcccaggatt ccccaaagag aaacactggc aagttagcaa tcagaacgtg	840
tctgacgtac aggtcgcatc cgtgtacgaa cgctagcagc acggatctaa cacaaacacg	900
gatctaacac aaacatgaac agaagtagaa ctaccgggcc ctaacctatg atggaccgga	960
acgccgatct agagaaggta gagagggggg ggggggggga ggacgagcgg cgtaccttga	1020
agcggagggtg ccgacgggtg gatttggggg agatctggtt gtgtgtgtgt gcgctccgaa	1080
caacacgagg ttggggaaag agggtgtgga ggggtgtct atttattacg gcgggcgagg	1140

aagggaaagc gaaggagcgg tgggaaagga atcccccgta gctgccggtg ccgtgagagg	1200
aggaggaggc cgcctgccgt gccggctcac gtctgccgct ccgccacgca atttctggat	1260
gccgacagcg gagcaagtcc aacggtggag cggaactctc gagaggggtc caggatgtga	1320
agaacaggta aatcacgcag aagaacccat ctctgatagc agctatcgat tagaacaacg	1380
aatccatatt gggtcctgtg gaaatactta ctgcacagga agggggcgat ctgacgaggc	1440
cccgccaccg gcctcgaccc gagggcgagg ccgacgaagc gccggcgagt acggcgccgc	1500
ggcggcctct gcccgigccc tctgcgcgtg ggagggagag gccgcggttg tgggggcgcg	1560
cgcgcgcgcg cgcgcagctg gtgcggcggc gcgggggtca gccgccgagc cggcggcgac	1620
ggaggagcag ggcggcgttg acgcgaactt ccgatcggtt ggtcagagtg cgcgagttgg	1680
gcttagccaa ttaggtctca acaatctatt gggccgtaaa attcatgggc cctggtttgt	1740
ctaggcccaa tatcccgttc atttcagccc acaaatattt cccagagga ttattaaggc	1800
ccacacgcag cttatagcag atcaagtacg atgtttcctg atcgttggat cggaaacgta	1860
cggctcttgat caggcatgcc gacttcgtca aagagaggcg gcatgacctg acgcggagtt	1920
ggttccgggc accgtctgga tggctgtacc gggaccggac acgtgtcgcg cctccaacta	1980
catggacacg tgttggtgctg ccattggggc gtacgcgtgg cggtgaccgc accggatgct	2040
gcctcgcacc gccttgccca cgctttatat agagaggttt tctctccatt aatcgcatag	2100
cgagtcgaat cgaccgaagg ggagggggag cgaagctttg cgttctctaa tcgcctcgtc	2160
aaggtaacta atcaatcacc tcgtcctaat cctcgaatct ctctgtgtgc ccgtctaate	2220
tcgcgatttt gatgctcgtg gtggaaagcg taggaggatc ccgtgcgagt tagtctcaat	2280
ctctcagggt ttctgtcgat tttaggggtga tccacctctt aatcgagtta cggtttcgtg	2340
cgattttagg gtaatcctct taatctctca ttgatttagg gtttcgtgag aatcgaggta	2400
gggatctgtg ttattttatat cgatctaata gatggattgg ttttgagatt gttctgtcag	2460
atggggattg tttcgatata ttaccctaata gatgtgtcag atggggattg tttcgatata	2520
ttaccctaata gatgtgtcag atggggattg tttcgatata ttaccctaata gatggataat	2580
aagagtagtt cacagttatg ttttgatcct gccacatagt ttgagttttg tgatcagatt	2640
tagtttcact tatttgtgct tagttcggat gggattgttc tgatattgtt ccaatagatg	2700
aatagctcgt taggttaaaa tctttagggt gagttaggcg acacatagtt tatttctct	2760
ggatttggat tggaattgtg ttcttagttt ttttcccctg gatttggatt ggaattgtgt	2820
ggagctgggt tagagaatta catctgtatc gtgtacacct acttgaactg tagagcttgg	2880

gttctaaggt caatttaatc tgtattgtat ctggctcttt gcctagttag actgtagtgc 2940
tgatgttgta ctgtgttttt ttaccggttt tatttgcttt actcgtgcaa atcaaactg 3000
tcagatgcta gaactagggtg gctttattct gtgttcttac atagatctgt tgtcctgtag 3060
ttacttatgt cagttttgtt attatctgaa gatatttttg gttgttgctt gttgatgtgg 3120
tgtgagctgt gagcagcgct cttatgatta atgatgctgt ccaattgtag tgtaatatga 3180
tgtgattgat atgttcatct attttgagct gacagtaccg atatcgtagg atctgggtgcc 3240
aacttattct ccagctgctt ttttttacct atgttaattc caatcctttc ttgcctcttc 3300
cag 3303

<210> 2
<211> 215
<212> DNA
<213> 玉蜀黍

<400> 2
agaggggtgtg gaggggggtgt ctatttatta cggcgggcga ggaagggaaa gcgaaggagc 60
ggtgggaaaag gaatcccccg tagctgccgg tgccgtgaga ggaggaggag gccgcctgcc 120
gtgccggctc acgtctgccg ctccgccacg caatttctgg atgccgacag cggagcaagt 180
ccaacgggtgg agcggaactc tcgagagggg tccag 215

<210> 3
<211> 82
<212> DNA
<213> 玉蜀黍

<400> 3
cttgaagcgg aggtgccgac ggggtggattt gggggagatc tggttgtgtg tgtgtgcgct 60
ccgaacaaca cgaggttggg ga 82

<210> 4
<211> 1015
<212> DNA
<213> 玉蜀黍

<400> 4
tgcagaagta acaccaaaca acagggtgag catcgacaaa agaaacagta ccaagcaa 60
aatagcgta tgaaggcagg gctaaaaaaaa tccacatata gctgctgcat atgccatcat 120
ccaagtatat caagatcgaa ataattataa aacatacttg ttattataa tagataggta 180
ctcaagggtta gagcatatga atagatgctg catatgccat catgtatatg catcagtaaa 240
accacatca acatgtatac ctatcctaga tcgatatttc catccatctt aaactcgtaa 300

ctatgaagat gtatgacaca cacatacagt tccaaaatta ataaatacac caggtagttt 360
gaaacagtat tctactccga tctagaacga atgaacgacc gcccaaccac accacatcat 420
cacaaccaag cgaacaaaaa gcatctctgt atatgcatca gtaaaacccg catcaacatg 480
tatacctatc ctagatcgat atttccatcc atcatcttca attcgtaact atgaatatgt 540
atggcacaca catacagatc caaaattaat aaatccacca ggtagtttga aacagaattc 600
tactccgatc tagaacgacc gcccaaccag accacatcat cacaaccaag aaaaaaaaaa 660
gcatgaaaag atgacccgac aaacaagtgc acggcatata ttgaaataaa ggaaaagggc 720
aaaccaaacc ctatgcaacg aaacaaaaaa aatcatgaaa tcgatcccgt ctgcggaacg 780
gctagagcca tcccaggatt ccccaaagag aaacactggc aagttagcaa tcagaacgtg 840
tctgacgtac aggtcgcatc cgtgtacgaa cgctagcagc acggatctaa cacaacacg 900
gatctaacac aaacatgaac agaagtagaa ctaccgggcc ctaaccatgc atggaccgga 960
acgccgatct agagaaggta gagagggggg ggggggggga ggacgagcgg cgtac 1015

<210> 5
<211> 67
<212> DNA
<213> 稻

<400> 5
atagcgagtc gaatcgaccg aaggggaggg ggagcgaagc ttgcgttct ctaatcgctt 60
cgtcaag 67

<210> 6
<211> 1139
<212> DNA
<213> 稻

<400> 6
gtaactaatc aatcacctcg tcctaatect cgaatctctc gtggtgcccg tctaatectg 60
cgattttgat gctcgtggtg gaaagcgtag gaggatcccg tgcgagttgt ctcaatctct 120
cagggtttcg tgcgatttta ggggtgatcca cctcttaate gagttacggt ttcgtgcgat 180
tttagggtaa tcctcttaat ctctcattga tttagggttt cgtgagaatc gaggtaggga 240
tctgtgttat ttatatcgat ctaatagatg gattggtttt gagattgttc tgtcagatgg 300
ggattgtttc gatataattac cctaagatg tgtcagatgg ggattgtttc gatataattac 360
cctaagatg tgtcagatgg ggattgtttc gatataattac cctaagatg gataataaga 420
gtagttcaca gttatgtttt gatccgtcca catagtittga gttttgtgat cagatttagt 480
ttcacttatt tgtgccttagt tcggatggga ttgttctgat attgttccaa tagatgaata 540



gctcgttagg ttaaaatctt taggttgagt taggcgacac atagtttatt tcctctggat 600
ttggattgga attgtgttct tagttttttt cccctggatt tggattggaa ttgtgtggag 660
ctgggttaga gaattacatc tgtatcgtgt acacctactt gaactgtaga gcttgggttc 720
taagggtcaat ttaatctgta ttgtatctgg ctctttgcct agttgaactg tagtgctgat 780
gttgtactgt gtttttttac ccgttttatt tgctttactc gtgcaaataa aatctgtcag 840
atgctagaac taggtggctt tattctgtgt tcttacatag atctgttgtc ctgtagttac 900
ttatgtcagt ttgtttatta tctgaagata tttttggttg ttgcttggtg atgtgggtgtg 960
agctgtgagc agcgctctta tgattaatga tgctgtccaa ttgtagtgta atatgatgtg 1020
attgatatgt tcatctatct tgagctgaca gtaccgatat cgtaggatct ggtgccaaact 1080
tattctccag ctgctttttt ttacctatgt taattccaat cctttcttgc ctcttccag 1139

<210> 7
<211> 783
<212> DNA
<213> 稻

<400> 7
gatgtgaaga acaggtaaata cacgcagaag aacccatctc tgatagcagc tatcgattag 60
aacaacgaat ccataattggg tccgtgggaa atacctactg cacaggaagg gggcgatctg 120
acgaggcccc gccaccggcc tcgaccgag gccgaggccg acgaagcgcc ggcgagtacg 180
gcgccgcggc ggcctctgcc cgtgccctct gcgcgtggga gggagaggcc gcggtggtgg 240
gggcgcgcgc gcgcgcgcgc gcagctggtg cggcggcgcg ggggtcagcc gccgagccgg 300
cggcgacgga ggagcagggc ggcgtggacg cgaacttccg atcggttggg cagagtgcgc 360
gagttgggct tagccaatta ggtctcaaca atctattggg ccgtaaaatt catgggccct 420
ggtttgtcta ggcccaatat cccgttcatt tcagcccaca aatatttccc cagaggatta 480
ttaaggccca cacgcagctt atagcagatc aagtacgatg tttcctgatc gttggatcgg 540
aaacgtacgg tcttgatcag gcatgccgac ttcgtcaaag agaggcggca tgacctgacg 600
cggagttggg tccgggcacc gtctggatgg tcgtaccggg accggacacg tgtcgcgcct 660
ccaactacat ggacacgtgt ggtgctgcc a ttgggccgta cgcgtggcgg tgaccgcacc 720
ggatgctgcc tcgcaccgcc ttgccacgc tttatataga gaggttttct ctccattaat 780
cgc 783

<210> 8
<211> 1313

<212> DNA
<213> 玉蜀黍

<400> 8	
tgcagaagta acaccaaaca acaggggtgag catcgacaaa agaaacagta ccaagcaa	60
aatagcgta tgaaggcagg gctaaaaaaaa tccacatata gctgctgcat atgccatcat	120
ccaagtatat caagatcgaa ataattataa aacatacttg tttattataa tagataggta	180
ctcaagggtta gagcatatga atagatgctg catatgccat catgtatatg catcagtaaa	240
accacatca acatgtatac ctatcctaga tcgatatctt catccatctt aaactcgtaa	300
ctatgaagat gtatgacaca cacatacagt tccaaaatta ataaatacac caggtagt	360
gaaacagtat tctactccga tctagaacga atgaacgacc gcccaaccac accacatcat	420
cacaaccaag cgaacaaaaa gcatctctgt atatgcatca gtaaaacccg catcaacatg	480
tatacctatc ctagatcgat atttccatcc atcatcttca attcgtaact atgaatatgt	540
atggcacaca catacagatc caaaattaat aaatccacca ggtagtttga aacagaattc	600
tactccgac tagaacgacc gcccaaccag accacatcat cacaaccaag aaaaaaaaa	660
gcatgaaaag atgacccgac aaacaagtgc acggcatata ttgaaataaa ggaaaagggc	720
aaaccaaacc ctatgcaacg aaacaaaaaa aatcatgaaa tcgatcccgt ctgcggaacg	780
gctagagcca tcccaggatt ccccaaagag aaacactggc aagttagcaa tcagaacgtg	840
tctgacgtac aggtcgcac cgtgtacgaa cgctagcagc acggatctaa cacaaacacg	900
gatctaacac aaacatgaac agaagtagaa ctaccggggc ctaaccatgc atggaccgga	960
acgccgatct agagaaggta gagagggggg ggggggggga ggacgagcgg cgtaccttga	1020
agcggagggtg ccgacgggtg gatttggggg agatctgggt gtgtgtgtgt gcgctccgaa	1080
caacacgagg ttgggggaaag aggggtgtgga ggggggtgtct atttattacg gcgggcgagg	1140
aagggaaaagc gaaggagcgg tgggaaagga atccccgta gctgccggtg ccgtgagagg	1200
aggaggaggc cgctgccgt gccggctcac gtctgccgt ccgccacgca atttctggat	1260
gccgacagcg gagcaagtcc aacggtggag cggaactctc gagaggggtc cag	1313

<210> 9
<211> 1990
<212> DNA
<213> 稻

<400> 9	
gatgtgaaga acaggtaa	60
aatcacgaat ccataatggg tccgtgggaa atacttactg cacaggaagg gggcgatctg	120

acgaggcccc gccaccggcc tcgacccgag gccgaggccg acgaagcgcc ggcgagtacg	180
gcgccgcggc ggcctctgcc cgtgccctct gcgcgtggga gggagaggcc gcggtggtgg	240
gggcgcgcgc gcgcgcgcgc gcagctgggt cggcggcgcg ggggtcagcc gccgagccgg	300
cggcgacgga ggagcagggc ggcgtaggac cgaacttccg atcggttggg cagagtgcgc	360
gagttgggct tagccaatta ggtctcaaca atctattggg ccgtaaaatt catgggccct	420
ggtttgtcta ggcccaatat cccgttcatt tcagcccaca aatatttccc cagaggatta	480
ttaaggccca cagcgagctt atagcagatc aagtacgatg tttcctgatc gttggatcgg	540
aaacgtacgg tcttgatcag gcatgccgac ttcgtcaaag agaggcggca tgacctgacg	600
cggagttggg tccgggcacc gtctggatgg tcgtaccggg accggacacg tgtcgcgcct	660
ccaactacat ggacacgtgt ggtgctgcca ttgggccgta cgcgtggcgg tgaccgcacc	720
ggatgctgcc tcgcaccgcc ttgcccacgc tttatataga gaggttttct ctccattaat	780
cgcatagcga gtcgaatcga ccgaagggga gggggagcga agctttgcgt tctctaateg	840
cctcgtcaag gtaactaatc aatcacctcg tcctaatect cgaatctctc gtggtgcccc	900
tctaatectc cgattttgat gctcgtgggt gaaagcgtag gaggatcccc tgcgagttag	960
tctcaatect tcagggtttc gtgcgatttt agggtagatc acctcttaat cgagttacgg	1020
tttcgtgcga ttttagggta atcctcttaa tctctcattg atttaggggt tcgtgagaat	1080
cgaggtaggg atctgtgtta tttatatcga tctaatagat ggattgggtt tgagattgtt	1140
ctgtcagatg gggattgttt cgatatatta ccctaagat gtgtcagatg gggattgttt	1200
cgatatatta ccctaagat gtgtcagatg gggattgttt cgatatatta ccctaagat	1260
ggataataag agtagttcac agttatgttt tgatcctgcc acatagtttg agttttgtga	1320
tcagatttag ttacattat ttgtgcttag ttccgatggg attgttctga tattgttcca	1380
atagatgaat agctcgttag gttaaaatct ttaggttagg ttaggcgaca catagtttat	1440
ttcctctgga ttggattgg aattgtgttc ttagtttttt tcccctggat ttggattgga	1500
attgtgtgga gctgggttag agaattacat ctgtatcgtg tacacctact tgaactgtag	1560
agcttgggtt ctaaggtcaa tttaatctgt attgtatctg gctctttgcc tagttgaact	1620
gtagtgctga tgttgtactg tgttttttta cccgttttat ttgctttact cgtgcaaate	1680
aaatctgtca gatgctagaa ctaggtggct ttattctgtg ttcttacata gatctgttgt	1740
cctgtagtta cttatgtcag ttttgttatt atctgaagat atttttgggt gttgcttgtt	1800
gatgtgggtg gagctgtgag cagcgctctt atgattaatg atgctgtcca attgtagtgt	1860
aatatgatgt gattgatatg ttcattctatt ttgagctgac agtaccgata tcgtaggatc	1920

tggtgccaac ttattctcca gctgcttttt ttacctatg ttaattccaa tcctttcttg	1980
cctctttccag	1990
<210> 10	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 順向引子：TQ.8v6.1.F	
<400> 10	
gccataccct ccagttg	17
<210> 11	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引子：TQ.8v6.1.R	
<400> 11	
gccgttgatg gagtagtaga tgg	23
<210> 12	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 探針：TQ.8v6.1.MGB.P	
<400> 12	
ccgaatccaa cggcttca	18
<210> 13	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 順向引子：轉化酶 F	
<400> 13	
tggcggacga cgacttgt	18
<210> 14	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	反向引子：轉化酶 R	
<400>	14	
	aaagtttgga ggctgccgt	19
<210>	15	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	轉化酶探針	
<400>	15	
	cgagcagacc gccgtgtact t	21
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	AAD1 順向引子	
<400>	16	
	tgttcggttc cctctaccaa	20
<210>	17	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	AAD1 反向引子	
<400>	17	
	caacatccat caccttgact ga	22
<210>	18	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	AAD1 探針	
<400>	18	
	cacagaaccg tcgcttcagc aaca	24
<210>	19	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	SPC1a 引子	
<400>	19	
	cttagctgga taacgccac	19
<210>	20	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	SPC1s 引子	
<400>	20	
	gaccgtaagg cttgatgaa	19
<210>	21	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	TQSPC (FAM 探針)	
<400>	21	
	cgagattctc cgcgctgtag a	21
<210>	22	
<211>	5560	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	質體 pDAB113122 中驅動 Cry34Ab1 及 Cry35Ab1 轉基因之 合成雙向稻米泛素-3(Rubi3)啟動子之基因表現匣	
<400>	22	
	gcaaaacaca cctagactag atttgttttg ctaacccaat tgatattaat tatatatgat	60
	taatatttat atgtatatgg atttggttaa tgaaatgcat ctggttcac aaagaattat	120
	aaagacacgt gacattcatt taggataaga aatatggatg atctctttct cttttattca	180
	gataactagt aattacacat aacacacaac tttgatgccc acattatagt gattagcatg	240
	tcactatgtg tgcacccitt tatttcatac attaatlaag ttggccaatc cagaagatgg	300
	acaagtctag gttgttttaa ggttaccgag ctctgactca tgactcatga ctcaggactt	360
	gtggccgtag cgggaggagg tggctctggat ggtgtaggtc acgtgggact ggttgccgga	420
	gccgccctgg gtgatgatct cgtactggga cttgttggag tggccgtcgt atttgttggga	480
	gccggcgaac gggttgtcga agtagaggct gatctcggcc tcgccgttga tggagtagta	540



gatggtgccc	tcggtgccgg	tcatgaagcc	gttggattcg	gccacgaagg	tcttgatctg	600
gtcgttggcc	acgttggtcg	gggaggtgcg	ccacctgccg	ccgtcgagct	tggtcttgtc	660
ctccagctgg	agggtgtggc	cggctcttgt	gttcacgtcg	atgtgcacct	cgcgggcgga	720
catggtgtcg	tgtggatccg	gtacctcaac	taactactgt	acctgcagaa	gtaacaccaa	780
acaacagggt	gagcatcgac	aaaagaaaca	gtaccaagca	aataaatagc	gtatgaaggc	840
agggctaaaa	aaatccacat	atagctgctg	catatgccat	catccaagta	tatcaagatc	900
gaaataatta	taaaacatac	ttgtttatta	taatagatag	gtactcaagg	ttagagcata	960
tgaatagatg	ctgcatatgc	catcatgtat	atgcatcagt	aaaaccacac	tcaacatgta	1020
tacctatcct	agatcgatat	ttccatccat	cttaaactcg	taactatgaa	gatgtatgac	1080
acacacatac	agttccaaaa	ttaataaata	caccaggtag	tttgaaacag	tattctactc	1140
cgatctagaa	cgaatgaacg	accgccaac	cacaccacat	catcacaacc	aagcgaacaa	1200
aaagcatctc	tgtatatgca	tcagtaaaac	ccgcatcaac	atgtatacct	atcctagatc	1260
gatatttcca	tccatcatct	tcaattcgta	actatgaata	tgtatggcac	acacatacag	1320
atccaaaatt	aataaatcca	ccaggtagtt	tgaacagaa	ttctactccg	atctagaacg	1380
accgccaac	cagaccacat	catcacaacc	aagacaaaaa	aaagcatgaa	aagatgaccc	1440
gacaaacaag	tgcacggcat	atattgaaat	aaaggaaaag	ggcaaaccac	accctatgca	1500
acgaaacaaa	aaaaatcatg	aaatcgatcc	cgtctgcgga	acggctagag	ccatcccagg	1560
attccccaaa	gagaaacact	ggcaagttag	caatcagaac	gtgtctgacg	tacaggtcgc	1620
atccgtgtac	gaacgctagc	agcacggatc	taacacaaac	acggatctaa	cacaaacatg	1680
aacagaagta	gaactaccgg	gccctaacca	tgcattggacc	ggaacgccga	tctagagaag	1740
gtagagaggg	gggggggggg	ggaggacgag	cggcgtacct	tgaagcggag	gtgccgacgg	1800
gtggatttgg	gggagatctg	gttgtgtgtg	tgtgcgctcc	gaacaacacg	aggttgggga	1860
aagaggggtg	ggaggggggtg	tctattttatt	acggcgggcg	aggaagggaa	agcgaaggag	1920
cgggtgggaaa	ggaatcccc	gtagctgccg	gtgccgtgag	aggaggagga	ggccgcctgc	1980
cgtgccggct	cacgtctgcc	gctccgccac	gcaatttctg	gatgccgaca	gcggagcaag	2040
tccaacggtg	gagcggaaact	ctcgagaggg	gtccaggatg	tgaagaacag	gtaaatcacg	2100
cagaagaacc	catctctgat	agcagctatc	gattagaaca	acgaatccat	attgggtccg	2160
tgggaaatac	ttactgcaca	ggaagggggc	gatctgacga	ggccccgcca	ccggcctcga	2220
cccagggccg	aggccgacga	agcgcgggcg	agtacggcgc	cgcggcggcc	tctgcccgtg	2280
ccctctgcgc	gtgggagggga	gaggccgcgg	tgggtgggggc	gcgcgcgcgc	gcgcgcgcag	2340
ctggtgcggc	ggcgcggggg	tcagccgccg	agccggcggc	gacggaggag	cagggcgggc	2400
tggacgcgaa	cttccgatcg	gttggtcaga	gtgcgcgagt	tgggcttagc	caattaggtc	2460

tcaacaatct attgggccgt aaaattcatg ggccctggtt tgtctaggcc caatatcccg	2520
ttcatttcag cccacaaata tttccccaga ggattattaa ggcccacacg cagcttatag	2580
cagatcaagt acgatgtttc ctgateggtg gatcggaaac gtacgggtctt gatcaggcat	2640
gccgacttcg tcaaagagag gcggcatgac ctgacgcgga gttgggttcg ggcaccgtct	2700
ggatggtcgt accgggaccg gacacgtgtc gcgcctccaa ctacatggac acgtgtggtg	2760
ctgccattgg gccgtacgcg tggcggtgac cgcaccggat gctgcctcgc accgccttgc	2820
ccacgcttta tatagagagg tttctctctc attaatcgca tagcgagtcg aatcgaccga	2880
aggggagggg gagcgaagct ttgcgttctc taatcgctc gtcaaggtaa ctaatcaatc	2940
acctcgctct aatcctcgaa tctctcgtgg tgcccgtcta atctcgcgat ttgatgtctc	3000
gtggtggaag gcgtaggagg atcccgctgc agttagtctc aatctctcag ggtttcgtgc	3060
gatttttaggg tgatccacct cttaatcgag ttacggtttc gtgcgatttt agggtaatcc	3120
tcttaatctc tcattgattt agggtttcgt gagaatcgag gtagggatct gtgttattta	3180
tatcgatcta atagatggat tggttttgag attgttctgt cagatgggga ttgtttcgat	3240
atattaccct aatgatgtgt cagatgggga ttgtttcgat atattaccct aatgatgtgt	3300
cagatgggga ttgtttcgat atattaccct aatgatggat aataagagta gttcacagtt	3360
atgttttgat cctgccacat agtttgagtt ttgtgatcag atttagtttc acttatttgt	3420
gcttagttcg gatgggattg ttctgatatt gttccaatag atgaatagct cgttaggtta	3480
aaatcttttag gttgagttag gcgacacata gtttatttcc tctggatttg gatttgaatt	3540
gtgttcttag tttttttccc ctggatttgg atttgaattg tgtggagctg ggttagagaa	3600
ttacatctgt atcgtgtaca cctacttgaa ctgtagagct tgggttctaa ggtcaattta	3660
atctgtattg tatctggctc tttgcctagt tgaactgtag tgctgatgtt gtactgtgtt	3720
tttttaccog ttttatttgc tttactcgtg caaatcaaat ctgtcagatg ctagaactag	3780
gtggctttat tctgtgttct tacatagatc tgttgtcctg tagttactta tgtcagtttt	3840
gttattatct gaagatattt ttggttgttg ctgtttgatg tgggtgtgagc tgtgagcagc	3900
gctcttatga ttaatgatgc tgtccaattg tagtgtaata tgatgtgatt gatatgttca	3960
tctattttga gctgacagta ccgatatcgt aggatctggg gccaaacttat tctccagctg	4020
ctttttttta cctatgttaa ttccaatcct ttcttgcctc ttccagatcc agatatgact	4080
agctgacgcg gcagccatgc tggacaccaa caaagtctac gagatttcca accacgcgaa	4140
cggactttac gcagctacat atctttcgct cgatgactcg ggtgtgtctc tgatgaacaa	4200
gaatgatgac gacattgatg actacaacct caagtggttt ctcttcccca ttgatgatga	4260
ccagtacatc attacttctt atgctgccaa caactgcaaa gtttggaatg tgaacaatga	4320
taagatcaat gtcagcacct acagctcgac caattcgatc cagaagtggc agatcaaagc	4380



caatggttca agctacgtta tccaatccga caatggcaag gtcctcacag ctggcactgg	4440
ccaagccctc ggtctgatca gactgaccga tgagtcctcc aacaacccaa accagcaatg	4500
gaaccttact tccgtccaaa caatccagct gccacagaag cccatcattg acacaaagct	4560
gaaagactat cctaagtact cacctactgg caacattgac aatgggacgt ctccccagct	4620
gatgggctgg acgctggtgc cgtgtatcat ggtcaatgac ccaaacatcg acaagaacac	4680
tcagatcaag accactcctt actacatcct caagaagtat cagtactggc agagagcgg	4740
tggcagcaat gtggcactca gaccccatga gaagaagtca tacacctatg aatggggaac	4800
cgaaatcgat cagaaaacga ccatcatcaa cacgctcggg ttccagatca acatagactc	4860
gggaatgaag ttigacatcc cagaggtggg aggtggcaca gatgagatca agaccagtt	4920
gaatgaggaa ctgaagattg agtacagcca tgagacgaag atcatggaga agtatcaaga	4980
acaaagcgag atcgacaacc cgacagatca gagcatgaac tcaatagggt tcttgacat	5040
tactagtttg gagctttaca gatacaatgg ctacagagata aggatcatgc agattcagac	5100
gtccgacaat gacacctaca acgtgacgag ctatccgaac caccagcaag ccttgctgtg	5160
agtagttagc ttaatcacct agagctcgtt taaactgagg gcactgaagt cgcttgatgt	5220
gctgaattgt ttgtgatgtt ggtggcgtat ttgttttaa taagtaagca tggctgtgat	5280
tttatcatat gatcgatctt tggggtttta tttaacacat tgtaaaatgt gtatctatta	5340
ataactcaat gtataagatg tgttcattct tcggttgcca tagatctgct tatttgacct	5400
gtgatgtttt gactccaaaa accaaaatca caactcaata aactcatgga atatgtccac	5460
ctgtttcttg aagagttcat ctaccattcc agttggcatt tatcagtgtt gcagcggcgc	5520
tgtgctttgt aacataacaa ttgttacggc atatatccaa	5560

- <210> 23
- <211> 5548
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 質體 pDAB1131 中驅動 Cry34Ab1 及 Cry35Ab1 轉基因之
合成雙向稻米泛素-3(Rubi3)啟動子之基因表現匣

1

<400> 23	
ttggatatat gccgtaacaa ttgttatgtt acaaagcaca gcgccgctgc aacactgata	60
aatgccaaact ggaatggtag atgaactctt caagaaacag gtggacatat tccatgagtt	120
tattgagttg tgatttttgt ttttggagtc aaaacatcac aggtcaaata agcagatcta	180
tggcaaccga agaatgaaca catcttatac attgagttat taatagatac acattttaca	240
atgtgttaaa taaaacccca aagatcgatc atatgataaa atcacagcca tgcttactta	300

t t t a a c a a a a	a t a c g c c a c c	a a c a t c a c a a	a c a a t t c a g c	a c a t c a a g c g	a c t t c a g t g c	360
c c t c a g t t t a	a a c g a g c t c t	a g g t g a t t a a	g c t a a c t a c t	c a c a g c a a g g	c t t g c t g g t g	420
g t t c g g a t a g	c t c g t c a c g t	t g t a g g t g t c	a t t g t c g g a c	g t c t g a a t c t	g c a t g a t c c t	480
t a t c t c t g a g	c c a t t g t a t c	t g t a a a g c t c	c a a a c t a g t a	a t g g t c a a g a	a c c c t a t t g a	540
g t t c a t g c t c	t g a t c t g t c g	g g t t g t c g a t	c t c g c t t t g t	t c t t g a t a c t	t c t c c a t g a t	600
c t t c g t c t c a	t g g c t g t a c t	c a a t c t t c a g	t t c c t c a t t c	a a c t g g g t c t	t g a t c t c a t c	660
t g t g c c a c c t	c c c a c c t c t g	g g a t g t c a a a	c t t c a t t c c c	g a g t c t a t g t	t g a t c t g g a a	720
c c c g a g c g t g	t t g a t g a t g g	t c g t t t t c t g	a t c g a t t t c g	g t t c c c c a t t	c a t a g g t g t a	780
t g a c t t c t t c	t c a t g g g g t c	t g a g t g c c a c	a t t g c t g c c a	a c c g c t c t c t	g c c a g t a c t g	840
a t a c t t c t t g	a g g a t g t a g t	a a g g a g t g g t	c t t g a t c t g a	g t g t t c t t g t	c g a t g t t t g g	900
g t c a t t g a c c	a t g a t a c a c g	g c a c c a g c g t	c c a g c c c a t c	a g c t g g g g a g	a c g t c c c a t t	960
g t c a a t g t t g	c c a g t a g g t g	a g t a c t t a g g	a t a g t c t t t c	a g c t t t g t g t	c a a t g a t g g g	1020
c t t c t g t g g c	a g c t g g a t t g	t t t g g a c g g a	a g t a a g g t t c	c a t t g c t g g t	t t g g g t t g t t	1080
g g a g g a c t c a	t c g g t c a g t c	t g a t c a g a c c	g a g g g c t t g g	c c a g t g c c a g	c t g t g a g g a c	1140
c t t g c c a t t g	t c g g a t t g g a	t a a c g t a g c t	t g a a c c a t t g	g c t t t g a t c t	g c c a c t t c t g	1200
g a t c g a a t t g	g t c g a g c t g t	a g g t g c t g a c	a t t g a t c t t a	t c a t t g t t c a	c a t t c c a a a c	1260
t t t g c a g t t g	t t g g c a g c a t	a a g a a g t a a t	g a t g t a c t g g	t c a t c a t c a a	t g g g g a a g a g	1320
a a a c c a c t t g	a g g t t g t a g t	c a t c a a t g t c	g t c a t c a t t c	t t g t t c a t c a	g a g a c a c a c c	1380
c g a g t c a t c g	a g c g a a a g a t	a t g t a g c t g c	g t a a a g t c c g	t t c g c g t g g t	t g g a a a t c t c	1440
g t a g a c t t t g	t t g g t g t c c a	g c a t g g t g t c	g t g t c a a c t a	a c t a c t g t a c	c c t g c a g a a g	1500
t a a c a c c a a a	c a a c a g g g t g	a g c a t c g a c a	a a a g a a a c a g	t a c c a a g c a a	a t a a a t a g c g	1560
t a t g a a g g c a	g g g c t a a a a a	a a t c c a c a t a	t a g c t g c t g c	a t a t g c c a t c	a t c c a a g t a t	1620
a t c a a g a t c g	a a a t a a t t a t	a a a c a t a c t	t g t t t a t t a t	a a t a g a t a g g	t a c t c a a g g t	1680
t a g a g c a t a t	g a a t a g a t g c	t g c a t a t g c c	a t c a t g t a t a	t g c a t c a g t a	a a a c c c a c a t	1740
c a a c a t g t a t	a c c t a t c c t a	g a t c g a t a t t	t c c a t c c a t c	t t a a a c t c g t	a a c t a t g a a g	1800
a t g t a t g a c a	c a c a c a t a c a	g t t c c a a a a t	t a a t a a a t a c	a c c a g g t a g t	t t g a a a c a g t	1860
a t t c t a c t c c	g a t c t a g a a c	g a a t g a a c g a	c c g c c c a a c c	a c a c c a c a t c	a t c a c a a c c a	1920
a g c g a a c a a a	a a g c a t c t c t	g t a t a t g c a t	c a g t a a a a c c	c g c a t c a a c a	t g t a t a c c t a	1980
t c c t a g a t c g	a t a t t t c c a t	c c a t c a t c t t	c a a t t c g t a a	c t a t g a a t a t	g t a t g g c a c a	2040
c a c a t a c a g a	t c c a a a a t t a	a t a a a t c c a c	c a g g t a g t t t	g a a a c a g a a t	t c t a c t c c g a	2100



tctagaacga	ccgcccgaacc	agaccacatc	atcacaacca	agacaaaaaa	aagcatgaaa	2160
agatgacccg	acaaacaagt	gcacggcata	tattgaaata	aaggaaaagg	gcaaaccaaa	2220
ccctatgcaa	cgaacaaaaa	aaaatcatga	aatcgatccc	gtctgcggaa	cggctagagc	2280
catcccagga	ttccccaag	agaaacactg	gcaagttagc	aatcagaacg	tgtctgacgt	2340
acaggctcgca	tccgtgtacg	aacgctagca	gcacggatct	aacacaaaca	cggatctaac	2400
acaaacatga	acagaagtag	aactaccggg	ccctaaccat	gcatggaccg	gaacgccgat	2460
ctagagaagg	tagagagggg	gggggggggg	gaggacgagc	ggcgtacctt	gaagcggagg	2520
tgccgacggg	tggatttggg	ggagatctgg	ttgtgtgtgt	gtgcgctccg	aacaacacga	2580
ggttggggaa	agaggggtgt	gaggggggtgt	ctatttatta	cggcgggcga	ggaagggaaa	2640
gcgaaggagc	ggtgggaaag	gaatcccccg	tagctgccgg	tgccgtgaga	ggaggaggag	2700
gccgcctgcc	gtgccggctc	acgtctgccg	ctccgccacg	caatttcttg	atgccgacag	2760
cggagcaagt	ccaacggtgg	agcgggaactc	tcgagagggg	tccaggatgt	gaagaacagg	2820
taaatcacgc	agaagaaccc	atctctgata	gcagctatcg	attagaacaa	cgaatccata	2880
ttgggtccgt	gggaaatact	tactgcacag	gaagggggcg	atctgacgag	gccccgccac	2940
cggcctcgac	ccgaggccga	ggccgacgaa	gcgccggcga	gtacggcgcc	gcggcggcct	3000
ctgcccgtgc	cctctgcgcg	tgggagggag	aggccgcggt	ggtggggggcg	cgcgcgcgcg	3060
cgcgcgcagc	tgggtcggcg	gcgcgggggt	cagccgccga	gccggcggcg	acggaggagc	3120
agggcggcgt	ggacgcgaac	ttccgatcgg	ttggtcagag	tgcgcgagtt	gggcttagcc	3180
aattaggtct	caacaatcta	ttgggccgta	aaattcatgg	gccctggttt	gtctaggccc	3240
aatatcccgt	tcatttcagc	ccacaaatat	ttccccagag	gattattaag	gcccacacgc	3300
agcttatagc	agatcaagta	cgatgtttcc	tgatcgttgg	atcggaacg	tacggtcttg	3360
atcaggcatg	ccgacttcgt	caaagagagg	cggcatgacc	tgacgcggag	ttggttccgg	3420
gcaccgtctg	gatggtcgta	ccgggaccgg	acacgtgtcg	cgcctccaac	tacatggaca	3480
cgtgtggtgc	tgccattggg	ccgtacgcgt	ggcggtgacc	gcaccggatg	ctgcctcgca	3540
ccgccttgcc	cacgctttat	atagagaggt	tttctctcca	ttaatcgcat	agcgagtcga	3600
atcgaccgaa	ggggaggggg	agcgaagctt	tgcgttctct	aatcgccctg	tcaaggtaac	3660
taatcaatca	cctcgtccta	atcctcgaat	ctctcgttgt	gcccgtctaa	tctcgcgatt	3720
ttgatgctcg	tgggtggaaag	cgtaggagga	tcccgtcgca	gttagtctca	atctctcagg	3780
gtttcgtgcg	attttaggggt	gatccacctc	ttaatcgagt	tacggtttctg	tgcgatttta	3840

gggtaatcct cttaatctct cattgattta gggtttcgtg agaatcgagg tagggatctg	3900
tgttatttat atcgatctaa tagatggatt ggttttgaga ttgttctgtc agatggggat	3960
tgtttcgata tattacccta atgatgtgtc agatggggat tgtttcgata tattacccta	4020
atgatgtgtc agatggggat tgtttcgata tattacccta atgatggata ataagagtag	4080
ttcacagtta tgttttgatc ctgccacata gtttgagttt tgtgatacaga tttagtttca	4140
cttatttgtg cttagttcgg atgggattgt tctgatattg ttccaataga tgaatagctc	4200
gttaggttaa aatctttagg ttgagttagg cgacacatag tttatttcct ctggatttgg	4260
attggaattg tgttcttagt ttttttcccc tggatttggga ttggaattgt gtggagctgg	4320
gttagagaat tacatctgta tctgtgtacac ctacttgaac tgtagagctt gggtttctaag	4380
gtcaatttaa tctgtattgt atctggctct ttgcctagtt gaactgtagt gctgatgttg	4440
tactgtgttt ttttaccctt tttatttgc tttactcgtgc aaatcaaata tgtcagatgc	4500
tagaactagg tggctttatt ctgtgttctt acatagatct gtgttcctgt agttacttat	4560
gtcagttttg ttattatctg aagatatatt tggttgttgc ttgttgatgt ggtgtgagct	4620
gtgagcagcg ctcttatgat taatgatgct gtccaattgt agtgtaatat gatgtgattg	4680
atatgttcat ctattttgag ctgacagtac cgatatcgta ggatctggtg ccaacttatt	4740
ctccagctgc ttttttttac ctatgttaat tccaatcctt tcttgcctct tccagatcca	4800
gatatgacta gctgacgcgg cagccatgtc cgccgcgag gtgcacatcg acgtgaacaa	4860
caagaccggc cacaccctcc agctggagga caagaccaag ctcgacggcg gcaggtggcg	4920
cacctccccg accaacgtgg ccaacgacca gatcaagacc ttcgtggccg aatccaacgg	4980
cttcatgacc ggcaccgagg gcaccatcta ctactccatc aacggcgagg ccgagatcag	5040
cctctacttc gacaaccctt tgcgcggctc caacaatac gacggccact ccaacaagtc	5100
ccagtacgag atcatcacc caggcggtc cggaaccag tcccacgtga cctacacat	5160
ccagaccacc tcctcccgt acggccacaa gtccctgagtc atgagtcatg agtcagagct	5220
cggtaacctt taaacaacct agacttgtcc atcttctgga ttggccaact taattaatgt	5280
atgaaataaa aggatgcaca catagtgaca tgctaatac tataatgtgg gcatcaaagt	5340
tgtgtgttat gtgtaattac tagttatctg aataaaagag aaagagatca tccatatttc	5400
ttatcctaaa tgaatgtcac gtgtctttat aattctttga tgaaccagat gcatttcatt	5460
aaccaaatcc atatacatat aaatattaat catatataat taatatcaat tgggttagca	5520
aaacaaatct agtctaggtg tgttttgc	5548



申請專利範圍

1. 一種合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其包含來自一玉蜀黍(*Zea mays*)泛素-1啓動子及一稻米泛素-3啓動子之數個啓動子元素。
2. 如請求項1之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其中該等啓動子元素包含一最小核心啓動子。
3. 如請求項2之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其中該最小核心啓動子包含一與序列辨識編號：2有至少90%序列同一性的多核苷酸序列。
4. 如請求項1之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其中該等啓動子元素包含一內含子。
5. 如請求項4之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其中該內含子包含一與序列辨識編號：4有至少90%序列同一性的多核苷酸序列。
6. 如請求項4之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其中該內含子包含一與序列辨識編號：6有至少90%序列同一性的多核苷酸序列。
7. 如請求項1之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其中該等啓動子元素包含一5'-UTR。
8. 如請求項7之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其中該5'-UTR包含一與序列辨識編號：3有至少90%序列同一性的多核苷酸序列。
9. 如請求項7之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其

中該5'-UTR包含一與序列辨識編號：5有至少90%序列同一性的多核苷酸序列。

10. 如請求項1之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其中該等啓動子元素包含一上游啓動子元素。
11. 如請求項10之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其中該上游啓動子元素包含一與序列辨識編號：7有至少90%序列同一性的多核苷酸序列。
12. 如請求項1之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其中該玉蜀黍泛素-1啓動子包含一與序列辨識編號：8有至少90%序列同一性的多核苷酸序列。
13. 如請求項1之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其中該稻米泛素-3啓動子包含一與序列辨識編號：9有至少90%序列同一性的多核苷酸序列。
14. 如請求項1之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，該合成雙向多核苷酸啓動子包含一與序列辨識編號：1有至少90%序列同一性的多核苷酸序列。
15. 如請求項14之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其包含一感興趣的第一多核苷酸序列，其可操縱地鏈接至該包含與序列辨識編號：1有至少90%序列同一性的多核苷酸序列之合成雙向多核苷酸之3'端。
16. 如請求項14之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其包含一感興趣的第二多核苷酸序列，其可操縱地鏈接至該包含與序列辨識編號：1有至少90%序列同一性的多核苷酸序列之合成雙向多核苷酸之5'端。

17. 如請求項15或16之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其中該感興趣的多核苷酸序列包含一性狀。
18. 如請求項17之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其中該性狀係選自於以下所構成的群組：殺蟲抗性性狀、除草劑耐受性性狀、氮利用效率性狀、水利用效率性狀、營養品質性狀、DNA結合性狀、可選標記性狀，以及其等之任一組合。
19. 一種用於生產基因轉殖植物細胞的方法，該方法包含：
 - a)用一基因表現匣來轉形一植物細胞，該基因表現匣包含一合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子，其可操縱地鏈接至至少一感興趣的多核苷酸序列；
 - b)單離包含該基因表現匣之經轉形的植物細胞；
 及，
 - c)生產一基因轉殖植物細胞，其包含可操縱地鏈接至該至少一感興趣的多核苷酸序列之該合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子。
20. 如請求項19之方法，其中轉形一植物細胞係用一植物轉形法來執行。
21. 如請求項20之方法，其中該植物轉形法係選自於以下所構成的群組：農桿菌(*Agrobacterium*)媒介的轉形法、基因槍(biolistics)轉形法、碳化矽(silicon carbide)轉形法、原生質體(protoplast)轉形法，以及脂質體(liposome)轉形法。
22. 如請求項19之方法，其中該感興趣的核苷酸序列係持續

表現遍及該基因轉殖植物細胞。

23. 如請求項19之方法，其中該感興趣的核苷酸序列係穩定地併入到該基因轉殖植物細胞的基因組中。

24. 如請求項19之方法，其中該方法進一步包含以下的步驟：

e)再生該基因轉殖植物細胞至該基因轉殖植物之內；以及，

f)獲得該基因轉殖植物，其中該基因轉殖植物包含該基因表現匣，該基因表現匣包含該合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啟動子，其可操縱地鏈接至該至少一感興趣的多核苷酸序列。

25. 如請求項19之方法，其中該基因轉殖植物細胞為一單子葉基因轉殖植物細胞或一雙子葉基因轉殖植物細胞。

26. 如請求項25之方法，其中該雙子葉基因轉殖植物細胞係選自於下列所組成的群組：阿拉伯芥(*Arabidopsis*)植物細胞、菸草植物細胞、大豆植物細胞、油菜植物細胞，以及棉花植物細胞。

27. 如請求項25之方法，其中該單子葉基因轉殖植物細胞係選自於下列所組成的群組：玉米(*maize*)植物細胞、稻米植物細胞、短柄草屬(*Brachypodium*)植物細胞，以及小麥植物細胞。

28. 如請求項19之方法，其中該合成稻米泛素-3雙向多核苷酸包含序列辨識編號：1。

29. 如請求項19之方法，其中該稻米泛素-3雙向多核苷酸啓

動子包含一感興趣的第一多核苷酸序列，其可操縱地鏈接至該包含序列辨識編號：1之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子之3'端。

30. 如請求項19之方法，其中該合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子包含一感興趣的第二多核苷酸序列，其可操縱地鏈接至該包含序列辨識編號：1之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子之5'端。

31. 一種用於在一植物細胞內表現一感興趣的多核苷酸序列的方法，該方法包含將可操縱地鏈接至一合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子之該感興趣的多核苷酸序列導入至該植物細胞內。

32. 如請求項31之方法，其中可操縱地鏈接至該合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子之該感興趣的多核苷酸序列，係透過一植物轉形法來導入至該植物細胞內。

33. 如請求項32之方法，其中該植物轉形法係選自於以下所構成的群組：農桿菌媒介的轉形法、基因槍轉形法、碳化矽轉形法、原生質體轉形法，以及脂質體轉形法。

34. 如請求項31之方法，其中該感興趣的多核苷酸序列係持續表現遍及該植物細胞。

35. 如請求項31之方法，其中該感興趣的多核苷酸序列係穩定地併入到該植物細胞的基因組中。

36. 如請求項31之方法，其中該基因轉殖植物細胞爲一單子葉植物細胞或一雙子葉植物細胞。

37. 如請求項36之方法，其中該雙子葉植物細胞係選自於下

- 列所組成的群組：阿拉伯芥植物細胞、菸草植物細胞、大豆植物細胞、油菜植物細胞，以及棉花植物細胞。
38. 如請求項36之方法，其中該單子葉植物細胞係選自於下列所組成的群組：玉米植物細胞、稻米植物細胞、短柄草屬植物細胞，以及小麥植物細胞。
 39. 如請求項19之方法，其中該合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子包含對序列辨識編號：1至少90%的序列同一性。
 40. 如請求項19之方法，其中該合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子包含一感興趣的第一多核苷酸序列，其可操縱地鏈接至該包含序列辨識編號：1之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子之3'端。
 41. 如請求項19之方法，其中該合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子包含一感興趣的第二多核苷酸序列，其可操縱地鏈接至該包含序列辨識編號：1之合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子之5'端。
 42. 一種基因轉殖植物細胞，其包含一合成稻米泛素-3雙向多核苷酸啓動子。
 43. 如請求項42之基因轉殖植物細胞，其中該基因轉殖植物細胞包含一基因轉殖品件。
 44. 如請求項43之基因轉殖植物細胞，其中該基因轉殖品件包含一農藝的性狀。
 45. 如請求項44之基因轉殖植物細胞，其中該農藝的性狀係選自於以下所構成的群組：殺蟲抗性性狀、除草劑耐受

性性狀、氮利用效率性狀、水利用效率性狀、營養品質性狀、DNA結合性狀、可選標記性狀，或是其等之任一組合。

46. 如請求項44之基因轉殖植物細胞，其中該農藝的性狀包含一除草劑耐受性性狀。
47. 如請求項46之基因轉殖植物細胞，其中該除草劑耐受性性狀包含一*aad-1*編碼序列。
48. 如請求項42之基因轉殖植物細胞，其中該基因轉殖植物細胞生產一商品產物。
49. 如請求項48之基因轉殖植物細胞，其中該商品產物係選自於以下所組成之群組：蛋白質濃縮物、蛋白質分離物、穀物、膳食、麵粉、油，或纖維。
50. 如請求項42之基因轉殖植物細胞，其中該基因轉殖植物細胞係選自於一雙子葉植物細胞或一單子葉植物細胞所組成的群組。
51. 如請求項50之基因轉殖植物細胞，其中該單子葉植物細胞為一玉米植物細胞。
52. 如請求項42之基因轉殖植物細胞，其中該合成稻米泛素-3雙向多核苷酸包含對序列辨識編號：1至少90%的序列同一性。

圖式
1/5

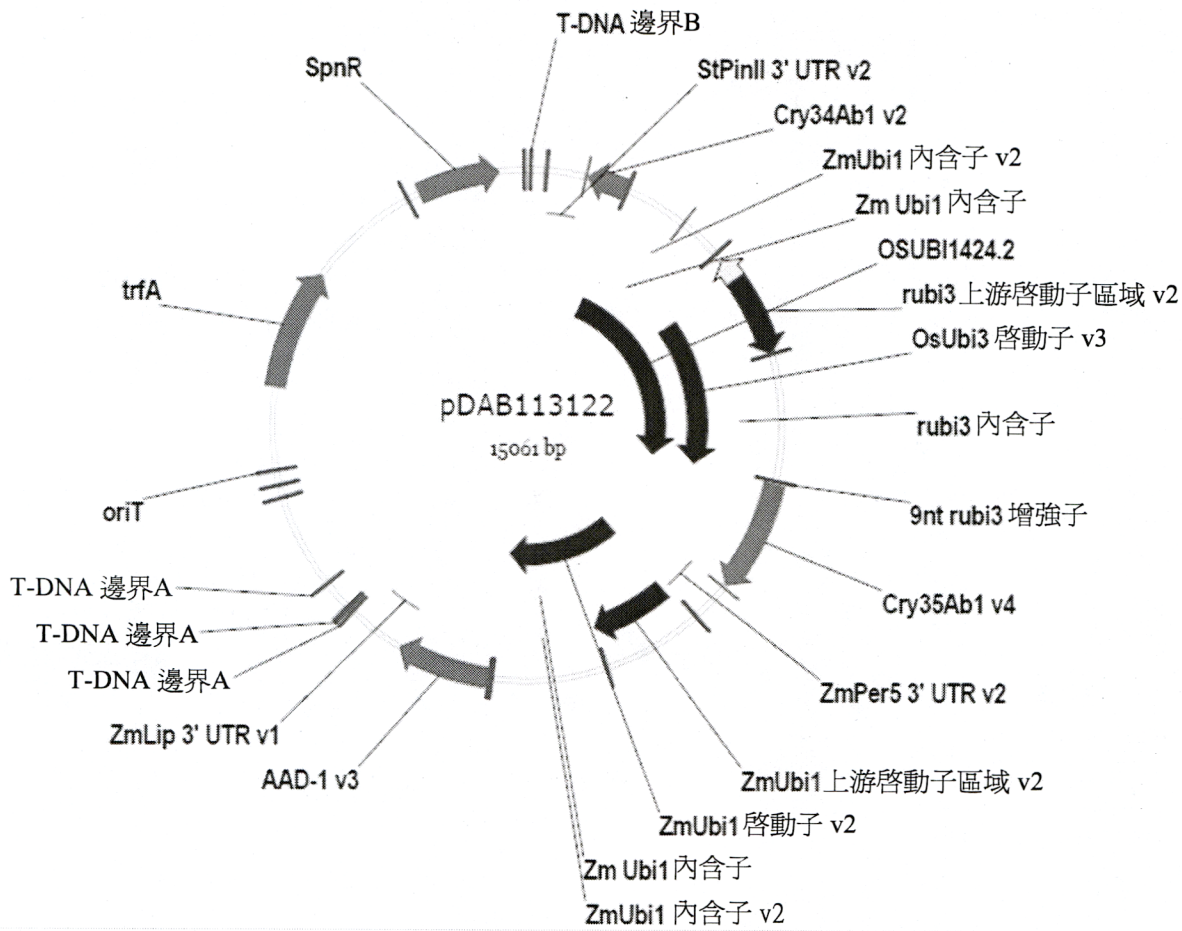


圖1

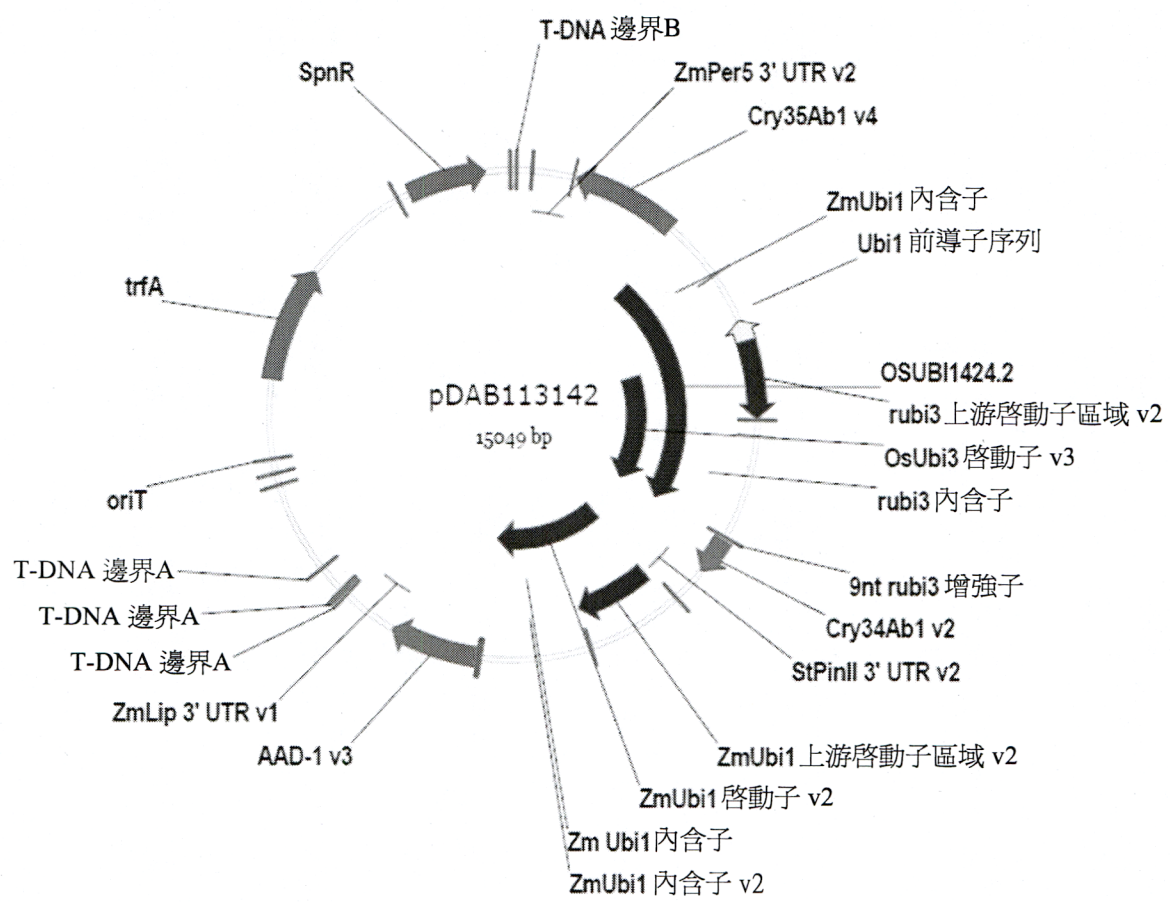


圖2

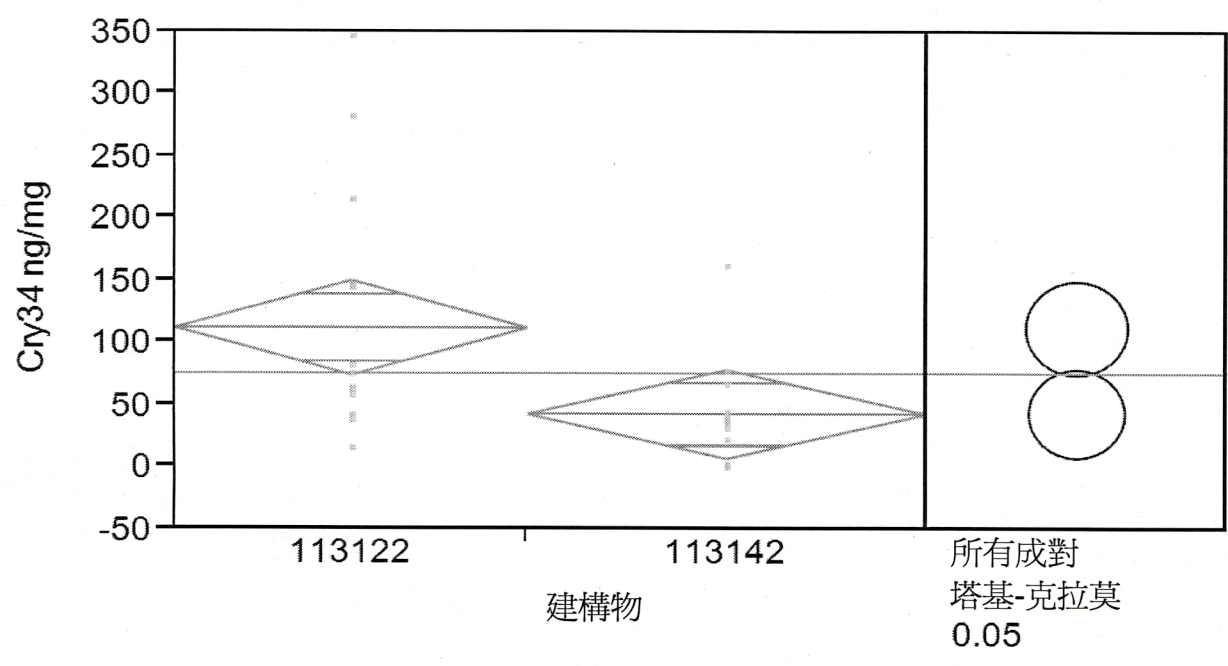


圖3

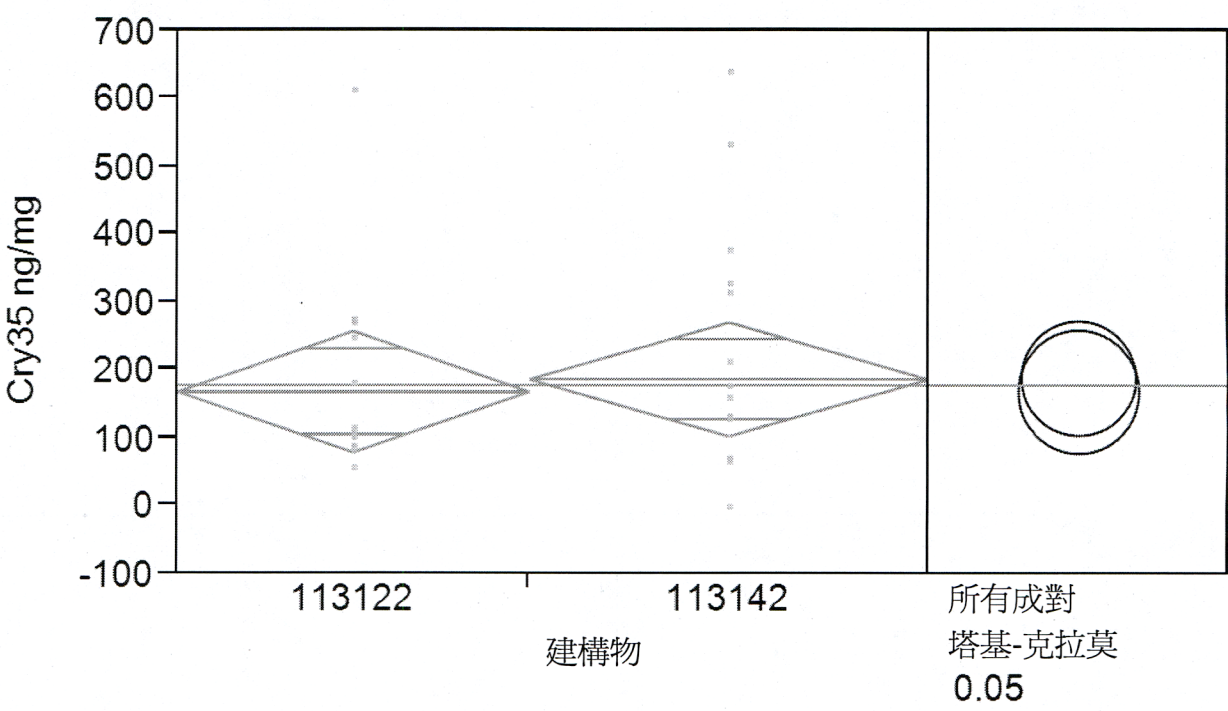


圖4

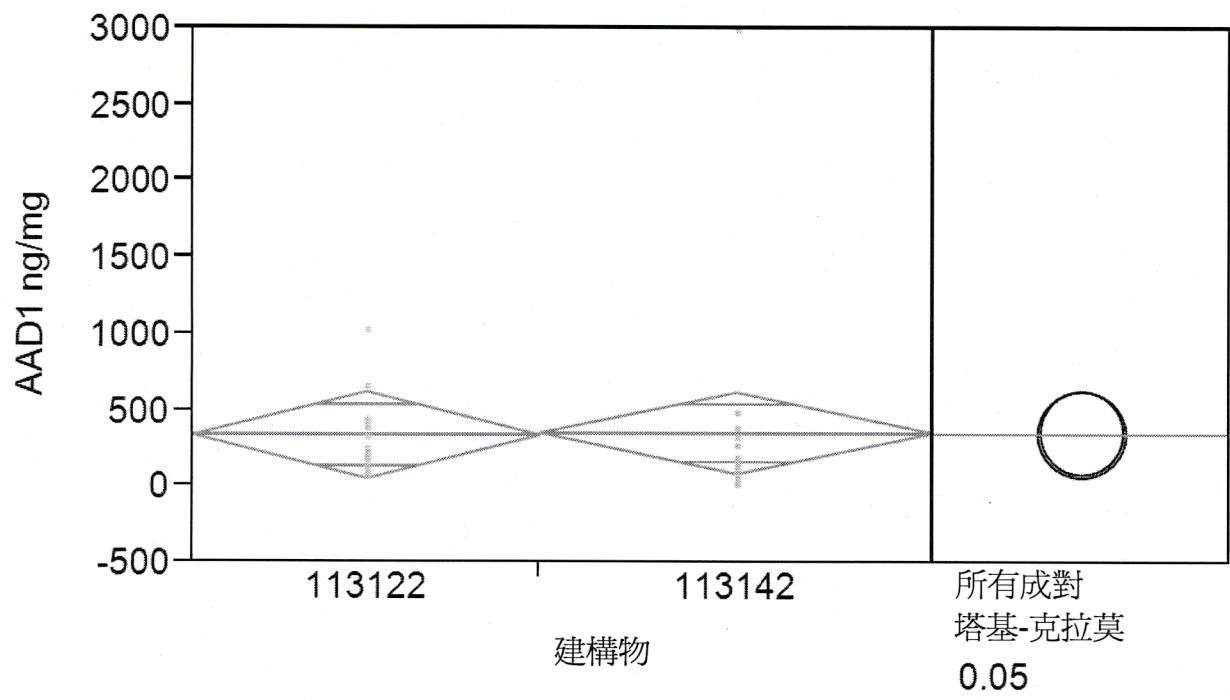


圖5