УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121197** (13) **C2**

(51) МПК
C12N 15/60 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2015 10668**

(22) Дата подання заявки: **02.04.2014**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **27.04.2020**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/809,097, 61/820,461**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **05.04.2013, 07.05.2013**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US**

(41) Публікація відомостей про заявку: **10.05.2016, Бюл.№ 9**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.04.2020, Бюл.№ 8**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/US2014/032706, 02.04.2014**

(72) Винахідник(и):
Айнлі У. Майкл (US),
Гущін Дмітрій Й. (US),
Хайден Меттью (US),
Ізенеггер Даніель (US),
Мейсон Джон (US),
Міллер Джеффрі С. (US),
Петоліно Джозеф Ф. (US),
Жань Ідун (US),
Соубрідж Тім (US),
Спангенберг Герман (US),
Уебб Стівен Р. (US)

(73) Власник(и):
ДОУ АГРОСАЙЕНСІС ЛЛС,
9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, United States of America (US),
САНГАМО БІОСАЙЄНСІС, ІНК.,
501 Canal Blvd., Suite A100, Richmond, California 94804, United States of America (US)

(74) Представник:
Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2011/049627A1, 28.04.2011
US 2009/029860 A1, 29.01.2009
US 7705139 B2, 27.04.2010
US 2007/033670 A1, 08.02.2007
Y. Zhang et al, "Transcription Activator-Like Effector Nucleases Enable Efficient Plant Genome Engineering", Plant Physiology, 02.11.2012, vol. 161, no. 1, P. 20 - 27
Townsend Jeffrey A et al, "High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases", Nature, Nature Publishing Group, United Kingdom, 21.05.2009, vol. 459, no. 7245, P. 442 - 445
Vipula K Shukla et al, "Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases", Nature, Nature Publishing Group, United Kingdom, vol. 459, no. 7245, 21.05.2009, P. 437
Voytas Daniel F, "Plant genome engineering with sequence-specific nucleases", Annual Review of Plant Biology, Annual Reviews, US, vol. 64, 01.04.2013, P. 327 - 350
Tzfira et al., "Genome modifications in plant cells by custom-made restriction enzymes", Plant Biotechnology Journal, 01.05.2012, vol. 10, no. ISS. 4, P. 373 - 389
Durai et al., "Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells", Nucleic Acids Research, 01.01.2005, vol. 33, no. 18, P. 5978 - 5990

UA 121197 C2

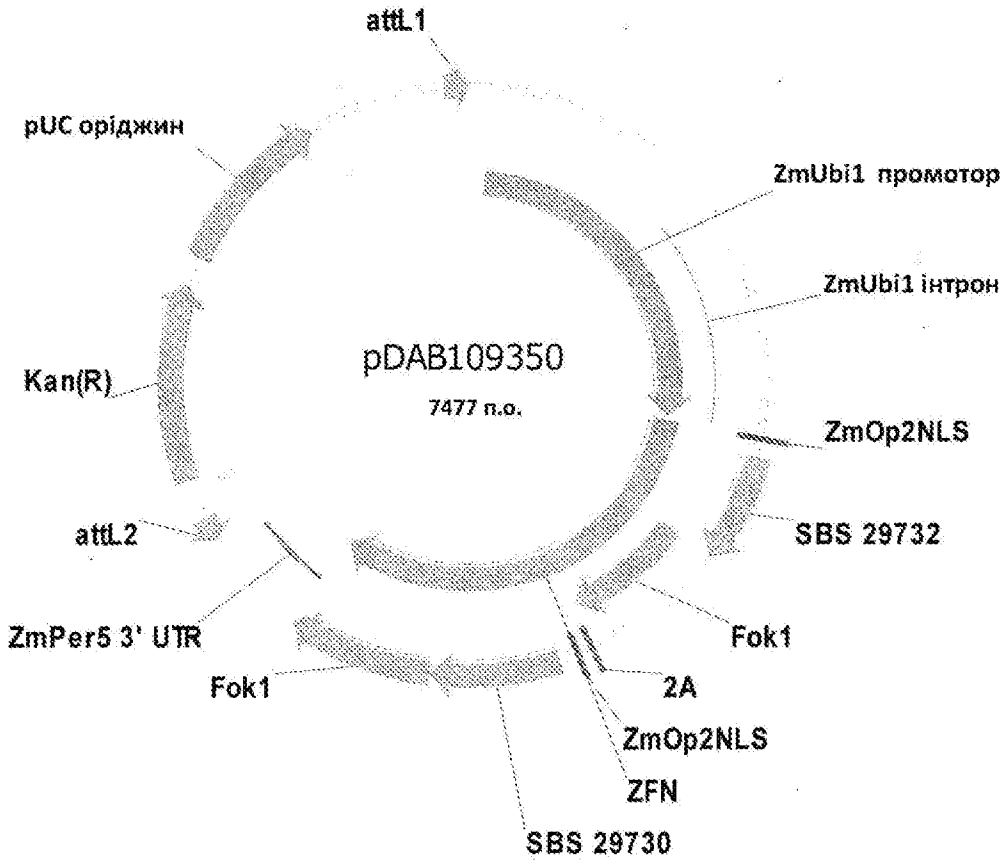
(54) НУКЛЕАЗА "ЦИНКОВІ ПАЛЬЦІ" ДЛЯ МОДИФІКАЦІЇ ГЕНА AHAS ТА СПОСІБ ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується рослинної клітини із підвищеною толерантністю до гербіциду на основі імідазолінону або сульфонілсечовини в порівнянні з рослинною клітиною, яка не була генетично модифікованою, де рослинна клітина включає націлену геномну модифікацію одного або більше алелів ендогенного гена синтази ацетогідроксикислоти (AHAS) і де геномна

модифікація являє собою інсерцію та/або делецію, яка продукує S653N або P197S мутацію в ендогенному гені або інтегрує екзогенну послідовність в AHAS ген, таким чином, що генетично модифікований AHAS ген продукує продукт, який приводить до одержання рослинної клітини, толерантної до гербіциду на основі імідазолінону або сульфонілсечовини. Винахід також стосується способу одержання рослинної клітини, нуклеази "цинкові пальці" для застосування для розщеплення AHAS гена рослини та способу селекції рослинних клітин.

Фігура 1: pDAB109350



ПЕРЕХРЕСНІ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка заявляє пріоритет попередньої заявки США під номером 61/809,097, що подана 5 квітня 2013 року, та попередньої заявки США під номером 61/820,461, що подана 7 травня 2013 року, розкриття яких є введеним у дану заявку як посилання у своїй повноті.

ЗАЯВА ЩОДО ПРАВ НА ВИНАХІД, ЯКИЙ ЗРОБЛЕНИЙ ЯК ДОСЛІДЖЕННЯ, ЩО ФІНАНСУЄТЬСЯ З ДЕРЖАВНОГО БЮДЖЕТУ

Не застосовується до даного випадку.

ПОСИЛАННЯ НА СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ, ЯКІ Є ПРЕДСТАВЛЕНИМИ В ЕЛЕКТРОННОМУ ВИГЛЯДІ

Офіційна копія списку послідовностей представляється в електронному вигляді при застосуванні EFS-Web як ASCII форматований список послідовностей з разом з описом. Список послідовностей, що міститься у цьому ASCII форматованому документі, являє собою частину опису та є введеним у дану заявку як посилання у своїй цілісності.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Дана заявка відноситься до галузі геномної інженерії, зокрема, до інтеграції екзогенних послідовностей у рослини, включаючи одночасне редагування геному множинних алелів на доповнення до множинних геномів, що є включеними у поліплоїдні рослини.

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВИНАХОДУ

Для вирішення проблеми зростаючого глобального попиту на виробництво продуктів харчування багато ефективних підходів до поліпшення продуктивності сільського господарства (наприклад, підвищений врожай або сконструйована стійкість до шкідників) покладаються або на мутаційну селекцію, або на введення нових генів у геноми видів сільськогосподарських культур шляхом трансформації. Обидва процеси за своєю природою є неспецифічними та відносно неефективними. Наприклад, звичайні способи трансформації рослин доставляють екзогенну ДНК, яка інтегрує у геном у випадкових місцях. Випадковий характер таких способів призводить до необхідності одержання та скринінгу сотень унікальних подій випадкової інтеграції на конструкцію для того, щоб ідентифікувати та ізолювати трансгенні лінії з бажаними характеристиками. Крім того, традиційні способи трансформації створюють декілька проблем для оцінки трансгена, які включають наступні: (а) труднощі щодо прогнозування, чи мають місце плейотропні ефекти, обумовлені ненавмисним порушенням генома; та (б) труднощі стосовно порівняння впливу різних регуляторних елементів та трансгенних конструкцій у межах одиничного кандидатного трансгена, оскільки такі порівняння ускладнюється випадковою інтеграцією у геном. В результаті цього традиційне конструювання характерної ознаки рослини є трудомістким і дорогим процесом з низькою ймовірністю успіху.

Точна модифікація гена долає технічні проблеми традиційних способів у рослинних системах та вже давно існує та як така, але являє собою недосяжну мету як у фундаментальних дослідженнях біології рослин, так і у сільськогосподарській біотехнології. Проте, за винятком "направленого (націленого) впливу на ген" за допомогою позитивної та негативної селекції на чутливість до препаратів на рисі або використання попередньо сконструйованих сайтів рестрикції, націлені модифікації геномів в усіх видах рослин, як у модельних, так і культурних, до недавнього були продемонстровані як такі, що є дуже складними. Terada та ін. (2002) Nat Biotechnol 20(10): 1030; Terada та ін. (2007) Plant Physiol 144(2): 846; D'Halluin та ін. (2008) Plant Biotechnology J. 6(1): 93.

Нещодавно були описані способи та композиції для націленого розщеплення геномної ДНК. Такі цільові події розщеплення можуть використовуватися, наприклад, для індукції націленого мутагенезу, індукції націлених делецій послідовностей клітинних ДНК та можуть сприяти цільовій рекомбінації та інтеграції у попередньо визначеному хромосомному локусі. Дивись, наприклад, Urnov та ін. (2010) Nature 435(7042): 646-51; патенти США №№ 8,586,526; 8,586,363; 8,409,861; 8,106,255; 7,888,121; 8,409,861 та патентні публікації США №№20030232410; 20050026157; 20090263900; 20090117617; 20100047805; 20100257638; 20110207221; 20110239315; 20110145940, розкриття яких є введеним у дану заявку як посилання у своїй цілісності для усіх цілей. Розщеплення може відбуватися за рахунок використання специфічних нуклеаз, таких як сконструйовані нуклеази білкового домена "цинкові пальці" (ZFN), ефекторні нуклеази, подібні до активатора транскрипції (TALEN), або при використанні CRISPR/Cas системи із сконструйованою crРНК/tracrРНК ('одинична РНК-провідник') для направлення специфічного розщеплення. Публікація патентної заявки США № 20080182332 описує застосування неканонічних нуклеаз білкового домена "цинкові пальці" (ZFN) для націленої модифікації геномів рослин; патент США № 8,399,218 описує опосередковану ZFN націлену модифікацію локусу EPSPS рослин; патент США № 8,329,986 описує націлену модифікацію локусу Zp15 рослин та патент США № 8,592,645 описує націлену модифікацію генів рослин, що

є залученими у біосинтез жирних кислот. Крім того, Moehle та ін. (2007) Proc. Natl. Acad, Sci. USA 104(9): 3055-3060 описує застосування сконструйованих ZFN для націленого додання генів у певному передбаченому локусі. Публікація патентної заявки США №20110041195 описує способи для створення гомозиготних диплоїдних організмів.

Стекінг (укладання азотистих основ у пакет) трансгена (або характерної ознаки) має великий потенціал для вирощування рослин, проте має доведену складність. Дивись, наприклад, Halpin (2005) Plant Biotechnology Journal 3: 141-155. Крім того, поліплоїдія, при якій організм має дві або більше дубльованих (аутоплоїд) або споріднених (алоплоїд) спарених наборів хромосом, частіше зустрічається у видах рослин, ніж у тварин. Наприклад, пшениця має лінії, які є диплоїдними (два набори хромосом), тетраплоїдними (чотири набори хромосом) та гексаплоїдними (шість наборів хромосом). Крім того, багато важливих для сільського господарства рослини роду Brassica також є алотетраплоїдами.

Таким чином, існує потреба у композиціях та способах для ідентифікації, селекції та швидкого розвитку стабільно націленої інтеграції у точних місцях у геномі рослини, включаючи одночасну модифікацію множинних алелів у межах різних геномів поліплоїдних рослин, для створення стабільних, здатних до успадковування генетичних модифікацій у рослині та її потомстві.

КОРОТКИЙ ВИКЛАД СУТІ ВИНАХОДУ

Дана заявка забезпечує способи та композиції для точної трансформації, націлювання генів, націлених геномних модифікацій та експресії білка у рослинах. Зокрема, дана заявка описує нову стратегію, вільну від трансгенного маркера, для інтеграції екзогенної послідовності та для одержання комплексу ознак, що використовує диференційну селекцію в ендогенному локусі (наприклад, у локусі синтази ацетогідроксикислоти (AHAS)) у рослинних геномах. Стратегія сприяє одержанню рослин, які мають один або більше трансгенів (або один, або більше генів, що представляють інтерес (GOI)), де трансгени не містять трансгенних селективних маркерних генів, що мають точне розташування в ендогенному локусі рослин, наприклад, в одному або декількох паралогах AHAS. Способи та композиції, що описані в даній заявці, дозволяють здійснювати як паралельний, так і послідовний стекінг трансгенів у геномах рослин, що мають точно таке саме розташування у геномі, включаючи одночасне редагування множинних алелів на декількох геномах поліплоїдних видів рослин. Крім того, способи та композиції згідно з даним винаходом дозволяють здійснювати селекцію за відсутності екзогенного трансгенного селективного маркера та/або геномну модифікацію ендогенного гена, де геномна модифікація забезпечує одержання мутації в ендогенному гені таким чином, що ендогенний ген виробляє продукт, який приводить до утворення толерантної до гербіцидів рослини (наприклад, шляхом використання відомих мутацій в ендогенному гені, таких як відомі мутації в гені AHAS, які надають стійкості до гербіцидів групи B або гербіцидів на основі інгібіторів ALS, таких як імідазолінони або сульфонілсечовини). Також забезпечуються клітини (наприклад, насіння), клітинні лінії, організми (наприклад, рослини), і т. д., що містять ці пакетовані трансгенаи та/або одночасно модифіковані алелі. Направлене редагування геномів (вставки, делеції, мутації, стекінг трансгенів) може приводити, наприклад, до збільшення врожайності, утворення білка, що кодує стійкість до захворювань, білка, який покращує ріст, білка, що кодує стійкість до комах, білка, що кодує стійкість до гербіцидів і т. д. Збільшення врожаю може включати, наприклад, підвищену кількість плодів або врожаю зерна, збільшення біомаси рослин (або плодів, або зерна рослини), високу частку м'якоті плодів, збільшення розміру рослин, збільшення сухої ваги, більш високу загальну вагу врожаю, підвищену інтенсивність та/або однорідність кольору врожаю, змінені хімічні характеристики (наприклад, вміст олії, жирних кислот, вуглеводів, білків) тощо.

Таким чином, в одному аспекті у даній заявці розкриваються способи та композиції для точної геномної модифікації (наприклад, стекінгу трансгенів) в одному або більше ендогенних алелів гена рослини. У деяких варіантах реалізації трансген(и) піддається(ються) інтеграції в ендогенний локус генома рослини (наприклад, поліплоїдної рослини). Трансгенна інтеграція включає інтеграцію множинних трансгенів, яка може бути паралельною (одночасна інтеграція одного або більше трансгенів в один або більше алелів) або послідовною. У деяких варіантах реалізації трансген не включає трансгенного маркера, проте піддається інтеграції у трансгенний локус, який піддається модифікації при інтеграції трансгена, що включає ознаку, наприклад, інтеграція трансгена(ів) у локус ендогенної синтази ацетогідроксикислоти (AHAS) (наприклад, 3' нетрансльовану ділянку локусу AHAS) так, що експресується транс ген, та AHAS локус піддається модифікації для зміни толерантності до гербіцидів (наприклад, гербіцидів групи B, гербіцидів на основі інгібітору ALS, таких як імідазолінон або сульфонілсечовина). Трансген(и) піддається(ються) інтеграції направленим чином при використанні однієї або більше

нуклеаз, які не існують у природі, наприклад, нуклеаз білкового домена "цинкові пальці", мегануклеаз, TALEN та/або CRISPR/Cas системи із сконструйованою одиничною РНК-провідником. Трансген може включати одну або більше кодуючих послідовностей (наприклад, білків), некодуючих послідовностей та/або може забезпечувати одну або більше молекул РНК (наприклад, мРНК, іРНК, міРНК, коротка шпилькова РНК, і т. д.). У деяких варіантах реалізації інтеграція трансгенів інтеє одночасною (паралельною). В інших втіленнях здійснюється послідовна інтеграція одного або більше трансгенів (GOI), наприклад, за допомогою AHAS локусу, шляхом чергування різних гербіцидних (гербіцидів групи В або гербіцидів на основі інгібітора ALS, таких як імідазолінон або сульфонілсечовина) хімічних селективних агентів та відомих AHAS мутацій, що надають толерантності до цих специфічних гербіцидів. Крім того, будь-яка з рослинних клітин, описаних у даній заявці, може додатково містити один або більше додаткових трансгенів, де додаткові трансгени інтегруються у геном в іншому локусі (або в різних локусах), ніж цільовий алель (алелі) для стекінгу трансгенів. Таким чином, безліч ендогенних локусів може включати інтегровані трансгени у клітинах, описаних в даній заявці.

В іншому аспекті, розкритому в даній заявці, клітини являють собою поліплоїдні рослинні клітини, в яких множинні алелі одного або більше генів різних геномів (субгеномів) були змінені одночасно. Направлені модифікації можуть підвищити або знизити активність гена (наприклад, активність ендогенного гена та/або активність інтегрованого трансгена) у поліплоїдній рослині, наприклад, мутацій у гені AHAS, які змінюють (наприклад, підвищують) стійкість до гербіцидів.

У деяких варіантах реалізації направлена геномна модифікація поліплоїдної клітини рослини включає в себе невеликі вставки та/або делеції, які також є відомими як інсерсійно-делеційні мутації. Будь-яка з рослинних клітин, описаних в даній заявці, може знаходитися у рослині або у частині рослини (наприклад, у насінні, квітах, плодах), наприклад, у будь-якому сорті: пшениці, сої, кукурудзи, картоплі, люцерни, рису, ячменю, соняшнику, томатів, Arabidopsis, бавовнику, видів Brassica (включаючи, але не обмежуючись такими, як B. napus, B. rapa, B. oleracea, B. nigra, B. juncea, B. carinata), Brachypodium, тимофіївка лугова та подібні до них.

Інший аспект, описаний в даній заявці, являє собою домен, що зв'язує ДНК (наприклад, білок "цинкових пальців" (ZFP)), що специфічно зв'язується з геном, який є залученим у толерантність до гербіцидів, наприклад, AHAS геном. Білок "цинкових пальців" може включати один або більше "цинкових пальців" (наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше "цинкових пальців"), та може бути сконструйований для зв'язування з будь-якою послідовністю у геномі поліплоїдної рослини. Будь-який з білків "цинкових пальців", описаних в даній заявці, може зв'язуватися з цільовим сайтом у кодуючій послідовності гена-мішені або у суміжних послідовностях (наприклад, промотором або іншими елементами експресії). У деяких варіантах реалізації білок "цинкових пальців" зв'язується з цільовим сайтом у гені AHAS, наприклад, як показано у Таблиці 3 та Таблиці 13. Спіральні ділянки розпізнавання типових "цинкових пальців", що зв'язують AHAS, є представленими у Таблиці 2 та Таблиці 12. Один або більше компонентів зв'язувальних доменів "цинкових пальців" білка "цинкових пальців" можуть бути канонічними (C2H2) "цинковими пальцями" або неканонічними (наприклад, C3H) "цинковими пальцями" (наприклад, N-термінальні та/або C-термінальні "цинкові пальці" можуть бути неканонічними пальцями).

В іншому аспекті в даній заявці розкриваються злиті білки, при цьому кожний злитий білок включає домен, що зв'язує ДНК (наприклад, білок "цинкових пальців"), що специфічно зв'язується з множинними алелями гена у поліплоїдних рослинних геномах. У деяких варіантах реалізації білки являють собою злиті білки, що включають білок "цинкових пальців" та функціональний домен, наприклад, домен активації транскрипції, домен репресії транскрипції та/або домен розщеплення (або половинний домен розщеплення). У деяких варіантах реалізації злитий білок являє собою нуклеазу білкового домена "цинкові пальці" (ZFN). Домени розщеплення або половинні домени розщеплення можуть бути одержані, наприклад, з різноманітних рестрикційних ендонуклеаз та/або хомінг ендонуклеаз. В одному втіленні половинні домени розщеплення мають походження від рестрикційної ендонуклеази типу IIS (наприклад, Fok I).

В інших аспектах даної заявки забезпечуються полінуклеотиди, що кодують будь-який з доменів, які зв'язують ДНК, та/або злиті білки, що описуються в даній заявці. У деяких варіантах реалізації, описаних в даній заявці, представлений експресійний вектор, що включає полінуклеотид, який кодує один або більше доменів, що зв'язують ДНК, та/або злиті білки, описані в даній заявці, оперативно зв'язаний з промотором. В одному втіленні один або більше злитих білків являють собою ZFN.

Домени, що зв'язують ДНК, та злиті білки, що включають такі домени, що зв'язують ДНК,

зв'язуються з та/або розщеплюють два або більше ендогенні гени у поліплоїдному геномі (наприклад, ген AHAS) у межах кодуючої ділянки гена або у некодуючій послідовності у межах цього гена або поряд з ним, такі, як наприклад, лідерна послідовність, трейлерна послідовність або інтрон, або промоторна послідовність, або у межах нетранскрибованої ділянки, або вище, або нижче від кодуючої ділянки, наприклад, у 3'-нетрансльованій ділянці. У деяких варіантах реалізації домени, що зв'язують ДНК, та/або злиті білки зв'язуються з та/або розщеплюють кодуючу послідовність або регуляторну послідовність цільового гена.

В іншому аспекті, описаному в даній заявці, представлені композиції, що включають один або більше білків, злитих білків або полінуклеотидів, описаних в даній заявці. Поліплоїдні рослинні клітини містять множинні геномні алельні мішені. Таким чином, композиції, що описуються в даній заявці, можуть включати один або більше білків, які зв'язують ДНК (та полінуклеотидів, що їх кодують), що роблять мішенню (та одночасно модифікують) множинні алелі, які є присутніми у множинних геномах (також мають назву субгеноми) поліплоїдної рослинної клітини. Білки, що зв'язують ДНК, можуть робити мішенями інші гени (паралоги), один або множинні (але менше, ніж усі) вибрані алелі.

В іншому аспекті у даній заявці забезпечується спосіб для одночасної зміни множинних алелів у множинних геномах поліплоїдної рослинної клітини, при цьому спосіб включає експресію одного або більше білків ДНК-зв'язувальних доменів (наприклад, білків "цинкових пальців" таких, як нуклеази білкового домена "цинкові пальці") у клітині так, що множинні алелі поліплоїдної рослини є зміненими. У деяких варіантах реалізації даної заявки змінюють експресію одного або більше генів AHAS у рослинній клітині, спосіб, що включає експресію одного або більше білків, які включають ДНК-зв'язувальні домени (наприклад, білків "цинкових пальців"), у клітині так, що змінюється експресія AHAS. У деяких варіантах реалізації способи включають застосування пари нуклеаз білкового домена "цинкові пальці" для створення інсерційно-делеційної мутації ("INDEL"), що порушує експресію ендогенного гена. В інших втіленнях спосіб включає застосування пари нуклеазбілкового домена "цинкові пальці" для поліпшення експресії гена, наприклад, за допомогою направленої інсерції екзогенної послідовності (наприклад, донорної послідовності, GOI або трангсгена) або елементів, які сприяють експресії. Змінена генна експресія/функція може призвести до збільшення фотосинтезу, підвищеної толерантності до гербіцидів та/або до модифікації росту у клітинах рослин.

В іншому аспекті у даній заявці забезпечуються нуклеїнові кислоти та антитіла, а також способи їх використання, для визначення та/або вимірювання зміненої експресії та модифікацій множинних алелів гена (наприклад, AHAS).

В іншому аспекті, описаному в даній заявці, забезпечується спосіб модифікації одного або більше ендогенних генів у поліплоїдній клітини рослини. У деяких варіантах реалізації спосіб включає: (а) введення у поліплоїдну рослинну клітину одного або більше векторів експресії, що кодують одну або більше нуклеаз (наприклад, ZFN, TALEN, мегануклеази та/або систем CRISPR/CAS), які зв'язуються з цільовим сайтом в одному або декількох генах за таких умов, що нуклеази розщеплюють один або більше ендогенних генів, змінюючи, таким чином, один або кілька ендогенних генів (наприклад, AHAS). В інших варіантах здійснення розщеплюється більше, ніж один алель ендогенного гена, наприклад, у поліплоїдних рослинах. В інших варіантах здійснення розщеплюється один або більше алелів більше, ніж одного ендогенного гена. Крім того, в будь-якому із способів, описаних в даній заявці, розщеплення одного або більше генів може приводити до делеції, вставки та/або заміни нуклеотидів у ділянці, що піддається розщепленню, наприклад, таким чином, що активність AHAS змінюється (наприклад, посилюється або знижується), дозволяючи таким чином здійснювати оцінку, наприклад, інтеграції трансгена у або поблизу модифікованих ендогенних генів.

Ще в одному аспекті, описаному у даній заявці, забезпечується спосіб введення однієї або більше екзогенних послідовностей в геном рослинної клітини, при цьому спосіб включає етапи: (а) контактування клітини з однією або більше екзогенних послідовностей (наприклад, донорним вектором, трансгеном або GOI, або їх комбінацією); і (б) експресію однієї або більше нуклеаз (наприклад, ZFN, TALEN, мегануклеази та/або системи CRISPR/CAS), як описано у даній заявці, у клітині, в якій одна або більше нуклеаз розщеплюють хромосомну ДНК так, що розщеплення хромосомної ДНК на стадії (б) стимулює включення екзогенної послідовності в геном шляхом гомологічної рекомбінації. У деяких варіантах здійснення хромосомну ДНК модифікують таким чином, що хромосомна послідовність (наприклад, ендогенний ген) піддається мутації для експресії продукту, який забезпечує здатний до селекції фенотип (наприклад, стійкість до гербіцидів). Кілька екзогенних послідовностей можуть бути інтегровані одночасно (паралельно) або стадії можуть повторюватися для послідовного додання трансгенів (стекінг (пакетування)

трансгенів). У деяких варіантах здійснення один або більше трансгенів вводяться в межах гена AHAS, наприклад, 3'-ділянка, яка не транслюється. У будь-якому з описаних у даній заявці способів, одна або більше нуклеаз можуть утворювати продукти злиття між доменом нуклеази (розщеплення) (наприклад, доменом розщеплення рестрикційної ендонуклеази типу IIs або мегануклеази) і сконструйованим доменом "цинкові пальці". В інших варіантах здійснення винаходу нуклеаза включає ефекторний домен TAL, хомінг ендонуклеазу та/або Crispr/Cas одиничну РНК-провідника. У будь-якому з описаних тут способів екзогенна послідовність може кодувати білковий продукт та/або продукувати молекулу РНК. У будь-якому з описаних у даній заявці способів екзогенна послідовність може бути інтегрована таким чином, що ендогенний локус, в який вбудовується екзогенна послідовність (послідовності), є модифікований для одержання одного або більше здатних до вимірювання фенотипів або маркерів (наприклад, стійкості до гербіцидів шляхом мутації ендогенної послідовності AHAS).

Ще в одному аспекті в даній заявці розкривається рослинна клітина, що містить націлену геномну модифікацію одного або більше алелів ендогенного гена в рослинній клітині, де геномна модифікація супроводжується розщепленням за допомогою сайт-специфічної нуклеази, при цьому геномна модифікація викликає мутацію в ендогенному гені так, що ендогенний ген виробляє продукт, який приводить до утворення толерантної до гербіцидів рослинної клітини. В одному варіанті здійснення винаходу геномна модифікація включає інтеграцію однієї або більше екзогенних послідовностей. В іншому варіанті здійснення винаходу геномна модифікація включає введення однієї або більше INDEL (інсерція-делеція), що викликає мутацію в ендогенному гені. У додатковому варіанті здійснення винаходу ендогенний ген з геномною модифікацією кодує білок, який надає стійкості до гербіцидів на основі сульфонілсечовини. В одному варіанті здійснення ендогенний ген з геномною модифікацією кодує білок, який надає стійкості до гербіцидів на основі імідазолінону. У додатковому варіанті здійснення екзогенна послідовність не кодує трансгенний селективний маркер. У додатковому варіанті здійснення екзогенна послідовність кодує білок, вибраний з групи, що складається з білка, який підвищує врожайність, білка, що кодує стійкість до захворювань, білка, який прискорює ріст, білка, що кодує стійкість до комах, білка, що кодує стійкість до гербіцидів, та їх комбінації. У подальших варіантах здійснення підвищений врожай культури включає збільшення врожаю плодів, врожаю зерна, біомаси, частки м'якоті плодів, збільшення розміру, сухої ваги, вмісту твердих речовин, ваги, підвищену інтенсивність забарвлення та/або однорідність кольору врожаю, змінені хімічні характеристики або їх комбінації. У деяких варіантах здійснення винаходу ендогенний ген являє собою ендогенний ген синтази ацетогідроксикислоти (AHAS). У додаткових варіантах здійснення дві або більше екзогенні послідовності інтегрують в ендогенний ген. У додатковому аспекті рослинна клітина являє собою клітину поліплоїдної рослини. В одному варіанті здійснення сайт-специфічна нуклеаза містить ДНК-зв'язувальний домен "цинкові пальці" та домен розщеплення FokI. Ще в одному варіанті здійснення ДНК-зв'язувальний домен "цинкові пальці" кодує білок, який зв'язується з сайтом-мішенню, вибраним з групи, що складається з SEQ ID NO: 35-56 і 263-278. В іншому варіанті здійснення винаходу рослину вибирають з групи, що складається з пшениці, сої, кукурудзи, картоплі, люцерни, рису, ячменю, соняшнику, томатів, Arabidopsis, бавовнику, видів Brassica та тимофіївки лугової.

Ще в одному аспекті, що розкривається в даній заявці, описується рослина, частина рослини, насіння або плоди, що включають одну або більше рослинних клітин, які містять націлену геномну модифікацію одного або більше алелів ендогенного гена в рослинній клітині, де геномна модифікація супроводжується розщепленням при використанні сайт-специфічної нуклеази, та де геномна модифікація викликає мутацію в ендогенному гені так, що ендогенний ген виробляє продукт, який приводить до одержання стійкої до гербіцидів рослинної клітини.

Ще в одному аспекті, розкритому в даній заявці, описується спосіб одержання рослинної клітини, як розкрито в даній заявці вище, де спосіб включає: експресію однієї або більше сайт-специфічних нуклеаз у рослинній клітині; та модифікацію одного або більше алелів ендогенного гена у множинних геномах поліплоїдної рослинної клітини. В одному втіленні ендогенний ген являє собою ген синтази ацетогідроксикислоти (AHAS). У додатковому втіленні модифікація порушує експресію ендогенного гена. Ще в одному аспекті така модифікація включає інтеграцію однієї або більше екзогенних послідовностей в один або більше алелів ендогенного гена. Крім того, рослина, частина рослини, насіння або плід, що включають одну або більше рослинних клітин, одержаних за допомогою цього способу, є розкритими в даній заявці як один з її аспектів.

Ще в одному аспекті, розкритому в даній заявці, представлено білок "цинкові пальці", що зв'язується з цільовим сайтом, вибраним з групи, що складається з SEQ ID NO:35-56 та 263-278. У додатковому білки "цинкові пальці" включають спіральні ділянки впізнання, що представлені в одному рядку Таблиці 2 або Таблиці 12.

Ще в одному аспекті, описаному в даній заявці, розкривається спосіб інтеграції однієї або більше екзогенних послідовностей у геном рослинної клітини, де спосіб включає: експресію однієї або більше сайт-специфічних нуклеаз у рослинній клітині, де одна або більше нуклеаз роблять мішенню та розщеплюють хромосомну ДНК в одному або більше ендогенних локусів; інтеграцію однієї або більше екзогенних послідовностей в один або більше ендогенних локусів у межах геному рослинної клітини, де один або більше ендогенних локусів є модифікованими так, що ендогенний ген піддається мутації для експресії продукту, що приводить до утворення здатного до селекції фенотипу у рослинній клітині; та селекцію рослинних клітин, які експресують здатний до селекції фенотип, де відбирають рослинні клітини, які включають одну або більше екзогенних послідовностей. У додатковому втіленні одна або більше екзогенних послідовностей є вибраними з групи, що складається з донорного полінуклеотиду, трансгена або будь-якої їх комбінації. В іншому втіленні інтеграція однієї або більше екзогенних послідовностей здійснюється шляхом гомологічної рекомбінації або поєднання негомологічних кінців. У додатковому втіленні одну або більше екзогенних послідовностей вбудовують одночасно або послідовно в один або більше ендогенних локусів. У додаткових втіленнях один або більше ендогенних локусів включають ген синтази ацетогідроксикислоти (AHAS). В одному втіленні ген AHAS розміщується а A, B або D геномі поліплоїдного геному. В іншому втіленні одна або більше екзогенних послідовностей є інтегрованими в AHAS ген. Ще в одному втіленні одна або більше екзогенних послідовностей кодують S653N мутацію AHAS. У додатковому втіленні одна або більше екзогенних послідовностей кодують P197S мутацію AHAS. В іншому втіленні специфічна для сайту нуклеаза є вибраною з групи, що складається з нуклеази "цинкові пальці", нуклеази TAL ефекторного домену, хомінг ендонуклеази, Crispr/Cas нуклеази одиничної РНК-провідника. У додатковому втіленні специфічна для сайту нуклеаза включає ДНК-зв'язувальний домен "цинкові пальці" та FokI домен розщеплення. В одному втіленні одна або більше екзогенних послідовностей кодують трансген або продукують молекулу РНК. В іншому втіленні трансген кодує білок, що є вибраним з групи, що складається з білка, який підвищує врожайність, білка, що кодує стійкість до захворювань, білка, який прискорює ріст, білка, що кодує стійкість до комах, білка, що кодує стійкість до гербіцидів та їх комбінації. У додаткових втіленнях інтеграція трансгена додатково включає введення однієї або більше INDEL, що порушують експресію одного або більше ендогенних локусів та забезпечують здатний до селекції фенотип. Подальші втілення способів додатково включають етапи культивування відібраних рослинних клітин, що включають одну або більше екзогенних послідовностей; та одержання цільної рослини, що включає одну або більше екзогенних послідовностей, інтегрованих в один або більше ендогенних локусів рослинного генома. У додатковому втіленні селективний агент включає імідазолінон, або селективний агент на основі сульфонілсечовини використовують для селекції рослинних клітин. В інших втіленнях цільну рослину, що включає одну або більше екзогенних послідовностей, інтегрованих в один або більше ендогенних локусів рослинного геному, піддають подальшій модифікації для вбудовування додаткової екзогенної послідовності у межах ендогенних локусів рослинного геному. У додаткових втіленнях одна або більше екзогенних послідовностей не кодують трансгенного селективного маркера.

Ще водному додатковому аспекті також забезпечується клітина рослини, одержана у відповідності із будь-яким зі способів, описаних в даній заявці.

В іншому аспекті даної заявки забезпечується рослина, яка включає клітину рослини, як описано в даній заявці.

В іншому аспекті в даній заявці забезпечується насіння рослини, що включає клітину рослини, яка одержана так, як описано в даній заявці.

В іншому аспекті в даній заявці забезпечується плід, який включає клітину рослини, яка одержана так, як описано в даній заявці.

У будь-якій з композицій (клітин або рослин) або у способах, описаних у даній заявці, клітина рослини може включати клітину дводольної або однодольної рослини. У деяких варіантах реалізації клітина рослини являє собою таку культурної рослини, наприклад, пшениці, томатів (або інших плодових рослин), картоплі, кукурудзи, сої, люцерни, тощо.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

Фігура 1 представляє плазмідну карту pDAB109350.

Фігура 2 представляє плазмідну карту pDAB109360.

Фігура 3 представляє плазмідну карту pDAS000132.

Фігура 4 представляє плазмідну карту pDAS000133.

Фігура 5 представляє плазмідну карту pDAS000134.

Фігура 6 представляє плазмідну карту pDAS000135.

Фігура 7 представляє плазмідну карту pDAS000131.

Фігура 8 представляє плазмідну карту pDAS000153.
Фігура 9 представляє плазмідну карту pDAS000150.
Фігура 10 представляє плазмідну карту pDAS000143.
Фігура 11 представляє плазмідну карту pDAS000164.
Фігура 12 представляє плазмідну карту pDAS000433.
Фігура 13 представляє плазмідну карту pDAS000434.
Фігура 14, панелі A та B являють собою схематичне зображення вільного від екзогенного маркера послідовного стекінгу трансгенів в ендогенному локусі AHAS у геномі пшениці Triticum aestivum при використанні відновлення ДНК, яке опосередковане ZFN та направляється NHEJ. Фігура 14A відображує перший пакет трансгенів; Фігура 14B відображує другий пакет трансгенів.
Фігура 15, панелі A та B являють собою схематичне зображення вільного від екзогенного маркера послідовного стекінгу трансгенів в ендогенному локусі AHAS у геномі пшениці Triticum aestivum при використанні відновлення ДНК, яке опосередковане ZFN та направляється NHEJ. Фігура 15A відображує перший пакет трансгенів; Фігура 15B відображує другий пакет трансгенів.
Фігура 16 являє собою схематичне відображення лінійної карти pDAS000435.
Фігура 17 являє собою схематичне відображення лінійної карти pDAS000436.
Фігура 18 представляє плазмідну карту pDAS0000004.
Фігура 19 представляє плазмідну карту QA_pDAS000434.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

Дана заявка відноситься до способів та композицій для інтеграції екзогенної послідовності, включаючи паралельну (одночасну) або послідовну інтеграцію екзогенної послідовності (включаючи стекінг трансгенів) у видах рослин, у тому числі в поліплоїдних рослинах. Способи та композиції, описані в даній заявці, є бажаними у забезпеченні націленої інтеграції у відібраний локус за відсутності застосування екзогенного трансгенного маркера для оцінки інтеграції Зокрема, диференційна селекція в ендогенному локусі при використанні моделі донора за відсутності трансгенного маркера, була продемонстрована для здійснення впливу на селекцію для цих цільових трансгенних подій шляхом зниження кількості відновлених неправильних подій інтеграції (Shukla та ін. (2009) Nature 459(7245):437-41). Крім того, дана заявка відноситься до геномної модифікації (наприклад, мутації) ендогенного локуса, де така мутація може приводити до одержання продукту, який служить як маркер (фенотип). Таким чином, дана заявка забезпечує інтеграцію екзогенної послідовності, включаючи стекінг трансгенів, в ендогенний локус, де ендогенний локус може служити як маркер для інтеграції (наприклад, локус AHAS, в яком одиничні мутації можуть виявляти свій вплив на стійкість до гербіцидів).

Інтеграція екзогенної(их) послідовності(ей) (наприклад, у локус AHAS) відбувається за сприяння націленого розщеплення дволанцюгової послідовніості гена, наприклад, шляхом розщеплення послідовності, розміщеної в 3' нетрансльованій ділянці. Розщеплення націлюється на цю ділянку при використанні злитих білків, що включають ДНК-зв'язувальний домен, такий як ДНК-зв'язувальний домен мегануклеази, ДНК-зв'язувальний домен лейцинової "застібки", ДНК-зв'язувальний домен TAL, білок "цинкові пальці" (ZFP); або при використанні Crispr/Cas РНК або химерних комбінацій вказаних вище елементів. Таке розщеплення стимулює інтеграція донорної(их) послідовності(ей) нуклеїнової кислоти у або поряд з ендогенним сайтом розщеплення. Інтеграція екзогенних послідовностей може здійснюватися при використанні механізмів, що залежать від гомології, або таких, що є незалежними від гомології, та селекція точно націлених подій досягається шляхом скринінгу на селективний маркер (наприклад, на стійкість до специфічної групи гербіцидів B або гербіцидів на основі інгібітору ALS, таких як імідазолінон або сульфонілсечовина), які є функціональними тільки у випадку правильно націлених подій.

У деяких варіантах реалізації нуклеаза(и) включає(ють) одну або більше ZFN, одну або більше TALEN, одну або більше мегануклеазу(и) та/або одну або більше CRISPR/Cas систему(и) нуклеаз. ZFN та TALEN типово включають домен розщеплення (або домен напіврозщеплення) та зв'язувальну ДНК "цинкових пальців" або ДНК зв'язувальний домен TALE-ефектора, та можуть бути введені як білки, як полінуклеотиди, що кодують ці білки, або як комбінації поліпептидів та полінуклеотидів, що кодують поліпептиди. ZFN та TALEN можуть функціонувати як химерні білки після димеризації напівдоменів розщеплення. Облігатні гетеродимерні нуклеази, в яких мономери нуклеази зв'язуються з "лівим" та "правим" доменами впізнання можуть асоціюватися з утворенням активної нуклеази, що вже була описана. Див., наприклад, патенти США № 8,623,618; 7,914,796; 8034,598. Таким чином, за наявності відповідних сайтів-мішеней "лівий" мономер може утворювати активну нуклеазу з будь-яким "правим" мономером. Це значно збільшує кількість корисних сайтів нуклеази на основі

перевірених лівого та правого доменів, які можуть використовуватися в різних комбінаціях. Наприклад, рекомбінація сайтів зв'язування чотирьох гомодимерних нуклеаз забезпечує одержання дванадцяти гетеродимерних нуклеаз. Ще більш важливим є те, що це дозволяє здійснювати системний підхід до конструювання трансгенів так, що кожна нова введена послідовність є фланкованою з боків унікальним сайтом зв'язування нуклеази, який може використовуватися для повторного вирізування гена або для націлювання додаткових генів, що розташовані поруч з ним. Крім того, цей спосіб може спростити стратегії стекінгу (пакетування) в один локус, який направляється залежними від нуклеази розривами подвійних ланцюгів.

Зв'язувальні домени "цинковиі пальці" можуть бути канонічними цинковими пальцями (C2H2) або неканонічними (наприклад, C3H) "цинковими пальцями", див., наприклад, публікацію патентної заявки США № 2008/0182332. Крім того, зв'язувальний домен "цинкові пальці" може включати один або більше "цинкових пальців" (наприклад, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або більше "цинкових пальців") та може бути сконструйований для зв'язування з будь-якою послідовністю у межах будь-якого ендогенного гена, наприклад, гена AHAS. Присутність такого злитого білка (або білків) у клітині приводить до зв'язування білка(ів) злиття з їх зв'язувальним(и) сайтом(сайтами) та розщеплення у межах цільового(их) гену(ів).

Загальний розділ

Якщо не вказано інше, то при практичному застосуванні способів, а також при отриманні та застосуванні композицій, які описуються в даній заявці, використовують загальноприйняті способи в галузях молекулярної біології, біохімії, структури та аналізу хроматину, обчислювальної хімії, культивування клітин, рекомбінантних ДНК та близьких до вказаних галузях техніки, як відомо фахівцям в даній галузі. Ці способи повністю описані в літературі. Див., наприклад, Sambrook та ін. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, друге видання, Cold Spring Harbor Laboratory Press, та третє видання, 2001; Ausubel та ін., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 та регулярні перевидання; серії METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, третє видання, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, том 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman та A. P. Wolffe, ред.), Academic Press, San Diego, 1999; та METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, том 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ред.) Humana Press, Totowa, 1999.

Визначення

Терміни "нуклеїнова кислота", "полінуклеотид" та "олігонуклеотид" використовують почергово, і вони стосуються дезоксирибонуклеотидного або рибонуклеотидного полімеру в лінійній або кільцевій конформації та в одноланцюговій або дволанцюговій формі. Для цілей даного опису ці терміни не треба розглядати як такі, що обмежують довжину полімеру. Терміни можуть включати відомі аналоги природних нуклеотидів, а також нуклеотиди, які модифіковані щодо основи, цукру та/або фосфату (наприклад, фосфоротіоатні скелети). Як правило, аналог конкретного нуклеотиду має таку ж саму специфічність спарювання основ; наприклад, аналог A утворює пару основ з T.

Терміни "поліпептид", "пептид" та "білок" використовують почергово для позначення полімеру, що складається з амінокислотних залишків. Термін також використовується для амінокислотних полімерів, в яких одна або декілька амінокислот являють собою хімічні аналоги або модифіковані похідні відповідних природних амінокислот.

"Зв'язування" стосується специфічної для послідовності нековалентної взаємодії між макромолекулами (наприклад, між білком та нуклеїновою кислотою). Не всі компоненти зв'язувальної взаємодії повинні бути специфічними для послідовності (наприклад, контакти між фосфатними залишками у скелеті ДНК), за умови, що в загальному випадку взаємодія є специфічною для послідовності. Такі взаємодії, як правило, характеризуються константою дисоціації (K_d) 10^{-6} M^{-1} або нижче. "Афінність" відноситься до сили зв'язування: більш висока афінність зв'язування корелює з меншою K_d. "Зв'язувальний білок" являє собою білок, який є здатним нековалентно зв'язуватися з іншою молекулою. Зв'язувальний білок може зв'язуватися, наприклад, з молекулою ДНК (ДНК-зв'язувальний білок), молекулою РНК (РНК-зв'язувальний білок) та/або молекулою білка (білок-зв'язувальний білок). У разі білок-зв'язувального білка він може зв'язуватися сам з собою (з утворенням гомодимерів, гомотримерів і т. д.), та/або він може зв'язуватися з однією або декількома молекулами іншого білка або білків. Зв'язувальний білок може мати більше одного типу зв'язувальної активності. Наприклад, білки "цинкові пальці" мають ДНК-зв'язувальну, РНК-зв'язувальну та білок-зв'язувальну активність.

"ДНК-зв'язувальний білок з цинковими пальцями" (або зв'язувальний домен) являє собою білок або домен в більш великому білку, який зв'язує ДНК специфічним для послідовності чином

за допомогою одного або декількох цинкових пальців, які являють собою області амінокислотної послідовності в зв'язувальному домені, структура яких є стабілізованою при використанні координаційної взаємодії з іоном цинку. Термін ДНК-зв'язувальний білок з цинковими пальцями часто скорочено позначають як білок з цинковими пальцями або ZFP.

"ДНК-зв'язувальний домен TALE" або "TALE" являє собою поліпептид, що включає один або більше TALE повторюваних доменів/одиниць. Повторювані домени є залученими у зв'язування TALE з його генетично спорідненою послідовністю ДНК. Одинична "повторювана одиниця" (також називається як "повтор") типово містить 33-35 амінокислот та включає гіперваріабельні подвійні залишки у положеннях 12 та/або 13, що називаються повторюваними варіабельними подвійними залишками (RVD, що є залученими у специфічність зв'язування ДНК. TALE повтори демонструють принаймні деяку гомологію послідовності с іншими TALE повторюваними послідовностями у межах існуючого у природі TALE білка. Див., наприклад, патент США № 8,586,526.

Зв'язувальні домени цинкових пальців та TALE домени можуть бути "сконструйованими" для зв'язування з попередньо визначеною нуклеотидною послідовністю. Необмежувальні приклади способів конструювання білків з цинковими пальцями являють собою конструювання та селекцію. Сконструйований білок з цинковими пальцями являє собою білок, що не зустрічається в природі, склад/композиція якого в основному є результатом раціональних критеріїв. Раціональні критерії складання включають застосування правил замін і комп'ютеризованих алгоритмів для обробки інформації в базі даних, що зберігає інформацію про існуючі конструкції ZFP та дані щодо зв'язування. Див., наприклад, патенти США № 6140081; 6453242; 6534261 та 6785613; також див. WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 і WO 03/016496 та патенти США № 6746838; 6866997 та 7030215.

"Відібраний" білок з цинковими пальцями або TALE являють собою білок, що не зустрічається в природі, отримання якого, головним чином, є результатом емпіричного способу, такого як фаговий дисплей, пастка для взаємодії або селекція гібридів. Див. наприклад, US 5789538; US 5925523; US 6007988; US 6013453; US 6200759; US 6733970; US RE39229 і WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197 і WO 02/099084.

Термін "послідовність" стосується нуклеотидної послідовності будь-якої довжини, яка може являти собою ДНК або РНК; може бути лінійною, кільцевою або розгалуженою і може бути одноланцюговою або дволанцюговою. Термін "донорна послідовність" стосується нуклеотидної послідовності, яка є вбудованою у геном. Донорна послідовність може мати будь-яку довжину, наприклад, довжину від 2 до 10000 нуклеотидів (або являти собою будь-яке ціле число між цими значеннями або бути більшим за це число), переважно може мати довжину приблизно від 100 до 1000 нуклеотидів (або являти собою будь-яке ціле число між цими значеннями), більш переважно - мати довжину приблизно від 200 до 500 нуклеотидів.

"Гомологічна неідентична послідовність" стосується першої послідовності, яка має певний ступінь ідентичності послідовностей з другою послідовністю, але послідовність якої не є ідентичною послідовності другої послідовності. Наприклад, полінуклеотид, що містить послідовність мутантного гена дикого типу, є гомологічним, але не ідентичним послідовності мутантного гена. У певних варіантах здійснення ступінь гомології між двома послідовностями є достатньою для забезпечення гомологічної рекомбінації між ними при використанням нормальних клітинних механізмів. Довжина двох гомологічних неідентичних послідовностей може бути будь-якою, а їх ступінь негомологічності може бути такою малою, як одиничний нуклеотид (наприклад, для корекції точкової геномної мутації за допомогою націленої гомологічної рекомбінації), або такою великою, як 10 або більше кілобаз (наприклад, для інсерції гена в попередньо визначений ектопічний сайт хромосоми). Довжина двох полінуклеотидів, що містять гомологічні неідентичні послідовності, не повинна бути однаковою. Наприклад, можна використовувати екзогенний полінуклеотид (тобто, донорний полінуклеотид) довжиною від 20 до 10000 нуклеотидів або пар нуклеотидів.

Способи визначення ідентичності нуклеїнових кислот та амінокислотних послідовностей є відомими в даній галузі техніки. Як правило, такі способи включають визначення нуклеотидної послідовності мРНК гена та/або визначення амінокислотної послідовності, що кодується нею, і порівняння цих послідовностей з другою нуклеотидною або амінокислотною послідовністю. Геномні послідовності також можна визначати та порівнювати у такий спосіб. В основному, ідентичність стосується точної відповідності нуклеотид-з-нуклеотидом або амінокислота-з-амінокислотою двох полінуклеотидних або поліпептидних послідовностей, відповідно. Дві або більше послідовностей (полінуклеотидні або амінокислотні) можна порівнювати, визначаючи процент їх ідентичності. Процент ідентичності двох послідовностей, послідовностей нуклеїнової

кислоти або амінокислотних послідовностей являє собою число точної відповідності між двома порівнюваними послідовностями, розділене на довжину більш коротких послідовностей і помножене на 100. Приблизне вирівнювання послідовностей нуклеїнової кислоти забезпечує алгоритм локальної гомології Сміта-Уотермана, Advances in Applied Mathematics 2: 482-489 (1981). Цей алгоритм можна застосовувати для амінокислотних послідовностей, використовуючи матрицю замін, розроблену Дайхоффом (Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M.O. Dayhoff ред., 5 додат. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA), та нормалізовану Грибсков (Gribskov, Nucl. Acids Res. 14(6): 6745-6763 (1986)). Ілюстративна реалізація цього алгоритму з визначенням проценту ідентичності послідовностей приведена в Genetics Computer Group (Madison, WI) у практичному додатку "BestFit". Параметри за умовчанням для цього способу описані в керівництві Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995) (доступному в Genetics Computer Group, Madison, WI). Переважним способом визначення процента ідентичності в контексті даного опису є використання пакету програм MPSRCH, що належить University of Edinburgh, розробленого John F. Collins і Shane S. Sturrok і поширюваного IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). Прийнятні програми для розрахунку проценту ідентичності або подібності між послідовностями є загальновідомими у даній галузі техніки, наприклад, інша програма вирівнювання являє собою BLAST, що використовує параметри за умовчанням. Наприклад, можна використовувати BLASTN і BLASTP з використанням наступних параметрів за умовчанням: генетичний код = стандартний; фільтр = відсутній; ланцюг = обидва; поріг = 60; очікування = 10; матриця = BLOSUM62; описи = 50 послідовностей; сортування = за найбільшим показником; бази даних = статистично невизначені, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + трансляція GenBank в CDS + Swiss protein + Spupdate + PIR. Подробиці стосовно цих програм можна знайти в Інтернеті. Відносно послідовностей, що описуються в даній заявці, то слід сказати, що діапазон бажаних ступенів ідентичності послідовностей складає приблизно від 80% до 100% та будь-яке значення, виражене цілим числом, між ними. Типово процент ідентичності послідовностей складає принаймні 70-75%, бажано 80-82%, більш бажано 85-90%, навіть більш бажано 92%, ще більш бажано 95%, та найбільш бажано 98% ідентичності послідовності уздовж визначеної довжини молекули, як визначається при використанні способів, описаних вище. Як використовується в даній заявці термін суттєво гомологічний використовується також для послідовностей, які демонструють повну ідентичність із зазначеною послідовністю ДНК або поліпептиду. Послідовності ДНК, що є суттєво гомологічними, можуть бути ідентифіковані в експерименті з гібридизації по Саузерну, наприклад, в жорстких умовах, як визначено для конкретної системи. Визначення відповідних умов гібридизації є відомими фахівцям в даній галузі техніки. Див., наприклад, Sambrook та ін., вище; Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, редактори B.D. Hames та S.J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press.

Селективну гібридизацію двох фрагментів нуклеїнової кислоти можна визначати так, як зазначено нижче. Ступінь ідентичності послідовностей двох молекул нуклеїнової кислоти впливає на ефективність та силу подій гібридизації між такими молекулами. Частково ідентична послідовність нуклеїнової кислоти принаймні частково інгібує гібридизацію повністю ідентичної послідовності з молекулою-мішенню. Інгібування гібридизації повністю ідентичної послідовності можна оцінювати при використанні аналізів гібридизації, які є добре відомими в даній галузі техніки (наприклад, Саузерн-блоттінг (ДНК), Нозерн-блоттінг (РНК), спосіб гібридизації у розчині або подібні до них, див Sambrook, та ін., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, друге видання, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Такі аналізи можна проводити з використанням різноманітних ступенів селективності, наприклад, при використанні умов, що варіюють від низького до високого ступеня жорсткості. Якщо використовують умови низької жорсткості, то відсутність неспецифічного зв'язування можна оцінювати при використанні вторинного зонду, який не має навіть часткового ступеня ідентичності послідовностей (наприклад, зонду, який має менше, ніж приблизно 30% ідентичності послідовності з молекулою-мішенню) так, що за відсутності подій неспецифічного зв'язування вторинний зонд не гібридизується з мішенню.

При використанні системи визначення на основі гібридизації вибирають зонд нуклеїнової кислоти, що є комплементарним еталонній послідовності нуклеїнової кислоти, а потім за допомогою підбору прийнятних умов зонд та еталонну послідовність піддають селективній гібридизації або зв'язують один з одним з формуванням дуплексної молекули. Молекула нуклеїнової кислоти, що здатна до селективної гібридизації з еталонною послідовністю в помірно жорстких умовах гібридизації, як правило, гібридизується в умовах, що дозволяють проводити визначення послідовності-мішені нуклеїнової кислоти довжиною принаймні приблизно 10-14 нуклеотидів, що має принаймні приблизно 70% ідентичності послідовності з послідовністю вибраного зонда нуклеїнової кислоти. Жорсткі умови гібридизації, як правило,

дозволяють здійснювати визначення послідовностей-мішеней нуклеїнової кислоти довжиною принаймні приблизно 10-14 нуклеотидів, які мають ідентичність послідовності, більшу ніж приблизно 90-95%, з послідовністю вибраного зонда нуклеїнової кислоти. Умови гібридизації, які є корисними для гібридизації зонда/еталонної послідовності, де зонд та еталонна послідовність мають певний ступінь ідентичності послідовностей, можна визначати так, як це є відомим у даній галузі техніки (див., наприклад, Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, редактори B.D. Hames та S.J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press).

Умови гібридизації є добре відомими фахівцям у даній галузі техніки. Жорсткість гібридизації стосуються ступеня, до якого умови гібридизації, що є несприятливими для утворення гібридів, які містять неспівпадаючі нуклеотиди, при більш високій жорстості корелюють з нижчою толерантністю для неспівпадаючих гібридів. Фактори, що впливають на жорсткість гібридизації, є добре відомими спеціалістам в даній галузі техніки та включають, але не обмежуються такими, як температура, pH, іонна силу і концентрація органічних розчинників, наприклад, таких як формамід та диметилсульфоксид. Як відомо фахівцям в даній галузі техніки, жорсткість гібридизації підвищується при підвищенні температури, зниженні іонної сили та зниженні концентрації розчинників.

Стосовно жорсткості умов гібридизації в даній галузі техніки є добре відомим, що для встановлення конкретної жорсткості можна використовувати множину еквівалентних умов, наприклад, варіюючи такі фактори, як довжина та природа послідовностей зонду, склад основ різних послідовностей, концентрації солей та інших компонентів розчину для гібридизації, присутність або відсутність в розчинах для гібридизації блокувальних агентів (наприклад, декстрансульфату та поліетиленгліколю), температура реакції гібридизації та часові параметри, а також змінюючи умови промивання. Вибір конкретного набору умов гібридизації проводять відповідно до стандартних способів в даній галузі техніки (див., наприклад, Sambrook та ін., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, друге видання, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.).

"Рекомбінація" стосується процесу обміну генетичною інформацією між двома полінуклеотидами. Для цілей даного опису "гомологічна рекомбінація (HR)" стосується спеціалізованої форми такого обміну, яка відбувається, наприклад, при відновленні подвійних розривів ланцюга в клітинах. Цей процес вимагає гомології нуклеотидних послідовностей, що використовує "донорну" молекулу для відновлення матриці молекули "мішені" (тобто, молекули, де відбувся подвійний розрив ланцюга) і під різними назвами є відомим як "некросоверна генна конверсія" або "генна конверсія на коротких ділянках", оскільки він приводить до перенесення генетичної інформації від донора до мішені. Без бажання бути пов'язаним з будь-якою конкретною теорією, таке перенесення може залучати корекцію невідповідностей гетеродуплекса ДНК, що формується між розірваною мішенню та донором, та/або "залежне від синтезу відпалювання ланцюга", в якому донор застосовують для повторного синтезу генетичної інформації, яка стає частиною мішені, та/або споріднені з цими процеси. Така спеціалізована HR часто приводить до зміни послідовності молекули-мішені так, що у полінуклеотид-мішень вбудовується частина або вся послідовність донорного полінуклеотиду.

"Розщеплення" стосується розриву ковалентного скелету молекули ДНК. Розщеплення можна ініціювати різноманітними способами, включаючи, але без обмеження такими, як ферментативний або хімічний гідроліз фосфодіефірного зв'язку. Є можливими як розщеплення одного ланцюга, так і розщеплення двох ланцюгів, крім того, дволанцюгове розщеплення може відбуватися як результат двох окремих подій одноланцюгового розщеплення. Розщеплення ДНК може приводити до утворення тупих кінців або липких кінців. У певних варіантах здійснення даного винаходу для направленого дволанцюгового розщеплення ДНК використовують злиті поліпептиди.

"Домен розщеплення" містить одну або декілька поліпептидних послідовностей, які мають каталітичну активність відносно розщеплення ДНК. Домен розщеплення може міститися в одному поліпептидному ланцюгу або розщеплювальна активність може бути результатом асоціації двох (або більше) поліпептидів.

"Напівдомен розщеплення" являє собою поліпептидну послідовність, яка в поєднанні з іншим поліпептидом (ідентичним або відмінним) утворює комплекс, що має розщеплювальну активність (переважно активність розщеплення подвійного ланцюга).

"Сконструйований напівдомен розщеплення" являє собою напівдомен розщеплення, що був модифікований таким чином, що він утворює облігатні гетеродимери з іншим напівдоменом розщеплення (наприклад, іншим сконструйованим напівдоменом розщеплення). Див. також патенти США № 7,914,796; 8,034,598; 8,623,618 та публікацію патентної заявки США № 2011/0201055, що є введеними у дану заявку як посилання у своїй цілісності.

"Хроматин" являє собою нуклеопротеїнову структуру, що включає клітинний геном.

Клітинний хроматин містить нуклеїнову кислоту, переважно ДНК, і білки, включаючи гістони та відмінні від гістонів хромосомні білки. Більшість хроматину еукаріотичних клітин є присутньою у формі нуклеосом, де ядро нуклеосоми містить приблизно 150 пар основ ДНК, асоційованих з октамером, що містить по два кожного з гістонів H2A, H2B, H3 і H4; та лінкерну ДНК (з варіабельною довжиною, що залежить від організму), розташовану між ядрами нуклеосом. Молекула гістону H, як правило, є асоційованою з лінкерною ДНК. Для цілей даного опису термін "хроматин" є призначеним для включення всіх типів клітинних нуклеопротеїнів, прокаріотичних та еукаріотичних. Клітинний хроматин включає хромосомний та епісомальний хроматин.

"Хромосома" являє собою хроматиновий комплекс, що включає весь геном клітини або його частину. Геном клітини часто характеризують за допомогою його каріотипу, що являє собою набір усіх хромосом, що містить геном клітини. Геном клітини може містити одну або більше хромосом.

"Епісома" являє собою нуклеїнову кислоту, яка реплікується, нуклеопротеїновий комплекс або іншу структуру, що містить нуклеїнову кислоту, що не є частиною хромосомного каріотипу клітини. Приклади епісом включають плазміди та певні вірусні геноми.

"Доступна ділянка " являє собою сайт у клітинному хроматині, де сайт-мішень, присутній в нуклеїновій кислоті, може бути зв'язаним екзогенною молекулою, що розпізнає цей сайт-мішень. Без бажання бути зв'язаним з будь-якою конкретною теорією, вважається, що відмінну структуру доступної ділянки часто можна визначити за її чутливістю до хімічних і ферментативних зондів, наприклад, нуклеаз.

"Сайт-мішень" або "послідовність-мішень" являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, яка визначає частину нуклеїнової кислоти, з якою буде зв'язуватися зв'язувальна молекула за умови наявності умов, достатніх для зв'язування. Наприклад, послідовність 5'-GAATTC-3' являє собою сайт-мішень для рестрикційної ендонуклеази EcoRI. Крім того, Таблиці 3 та 13 приводять список сайтів-мішеней для зв'язування спіралей впізнання ZFP у відповідності з Таблицею 2 та Таблицею 12.

"Екзогенна" молекула являє собою молекулу, яка в нормі не присутньою в клітині, але яку можна вводити в клітину за допомогою одного або більше генетичних, біохімічних або інших способів. "Присутність в клітині в нормі" визначають відносно конкретної стадії розвитку клітини та умов навколишнього середовища. Таким чином, наприклад, молекула, яка є присутньою у клітинах тільки на ранніх стадіях розвитку квітки, являє собою екзогенну молекулу по відношенню до повністю розвиненої квітки. Подібним чином, молекула, що індукується тепловим шоком, являє собою екзогенну молекулу стосовно клітини, яка не піддається тепловому шоку. Екзогенна молекула може включати, наприклад, кодуючу послідовність для будь-якого поліпептиду або його фрагменту, функціональну версію ендогенної молекули, що функціонує неналежним чином, версію неправильно функціонуючої ендогенної молекули або неправильно функціонуючу версію нормально функціонуючої ендогенної молекули. Крім того, екзогенна молекула може включати кодуючу послідовність з інших видів, яка є ортологом ендогенного гена у клітині хазяїна.

Екзогенна молекула може являти собою, серед інших, низькомолекулярну сполуку, таку як та, що отримана за допомогою способу комбінаторної хімії, або макромолекулу таку, як білок, нуклеїнова кислота, вуглевод, ліпід, глікопротеїн, ліпопротеїн, полісахарид і будь-яке модифіковане похідне вказаних вище молекул, або будь-який комплекс, що містить одну або декілька із вказаних вище молекул. Нуклеїнові кислоти включають ДНК та РНК, можуть бути одно- або дволанцюговими; можуть бути лінійними, розгалуженими або кільцевими; і можуть мати будь-яку довжину. Нуклеїнові кислоти включають нуклеїнові кислоти, здатні до формування дуплексів, а також нуклеїнові кислоти, що утворюють триплекси. Див., наприклад, патенти США №№ 5176996 та 5422251. Білки включають, але не обмежені такими, як ДНК-зв'язувальні білки, фактори транскрипції, фактори реконструкції хроматину, білки, які зв'язують метильовану ДНК, полімерази, метилази, деметилази, ацетилази, деацетилази, кінази, фосфатази, інтегрази, рекомбінази, лігази, топоізомерази, гірази та гелікази. Таким чином, термін включає "трансгени" або "гени, що представляють інтерес", які являють собою екзогенні послідовності, що є вбудованими у рослинну клітину.

Екзогенна молекула може бути молекулою того ж типу, що й ендогенна молекула, наприклад, екзогенним білком або нуклеїновою кислотою. Наприклад, екзогенна нуклеїнова кислота може включати інфекційний вірусний геном, плазміду або епісому, що вводиться в клітину, або хромосому, яка в нормі не є присутньою у клітині. Способи для введення екзогенних молекул у клітини є відомими фахівцям в даній галузі техніки та включають, але без обмеження такими, як трансформація протопластів, трансформація при використанні карбіду

кремнію (наприклад, WHISKERS™), опосередкована Agrobacterium mediated трансформація, опосередковане ліпідами перенесення (тобто, ліпосомами, що містять нейтральні та катіонні ліпіди), електропорація, безпосередня ін'єкція, злиття клітин, бомбардування частинками, співосадження з фосфатом кальцію, опосередковане DEAE-декстраном перенесення і опосередковане вірусним вектором перенесення.

На відміну від цього, "ендогенна" молекула являє собою молекулу, яка в нормі є присутньою в конкретній клітині на конкретній стадії розвитку в конкретних умовах навколишнього середовища. Наприклад, ендогенна нуклеїнова кислота може включати хромосому, геном мітохондрії, хлоропласта або іншої органели або існуючу у природі епісомальну нуклеїнову кислоту. Додаткові ендогенні молекули можуть включати білки, наприклад, фактори транскрипції та ферменти.

Як використовується в даній заявці, термін "продукт екзогенної нуклеїнової кислоти" включає як полінуклеотидні, так і поліпептидні продукти, наприклад, продукти транскрипції (полінуклеотиди такі, як РНК) та продукти трансляції (поліпептиди).

"Злита" молекула являє собою молекулу, в якій зв'язані дві або більше молекулярні субодиниці, переважно ковалентно. Молекулярні субодиниці можуть бути молекулами такого самого хімічного типу або можуть бути молекулами різних хімічних типів. Приклади злитої молекули першого типу включають, але без обмеження такими, як злиті білки, наприклад, білок злиття між доменом, що зв'язує ДНК (наприклад, ДНК-зв'язувальний домен ZFP, TALE та/або мегануклеази), та доменом нуклеази (розщеплення) (наприклад, ендонуклеази, мегануклеази, тощо) та злиті молекули нуклеїнової кислоти (наприклад, нуклеїнової кислоти, що кодує злитий білок, описаний в даній заявці). Приклади злитої молекули другого типу включають, але без обмеження такими, як злиття між нуклеїновою кислотою, що утворює триплекс, та поліпептидом, та злиття між агентом, який зв'язує малу бороздку, та нуклеїновою кислотою.

Експресія злитого білка у клітині може бути результатом доставки злитого білка у клітину або доставки у клітину полінуклеотиду, що кодує злитий білок, де полінуклеотид транскрибується, та транскрипт транслюється з утворенням злитого білка. Транс-сплайсинг, розщеплення поліпептидів та лігування поліпептидів також можуть бути залучені в експресію білка у клітині. Способи доставки полінуклеотидів та поліпептидів у клітину є представленими у будь-якій частині даного опису.

Термін "ген" для цілей даного опису включає ділянку ДНК, що кодує продукт гена (див. нижче), а також всі ділянки ДНК, які регулюють одержання продукту гена, незалежно від того, чи є регуляторні послідовності прилеглими до кодуючих та/або транскрибованих послідовностей, чи ні. Таким чином, ген включає, але не обов'язково обмежений такими, як послідовності промотора, послідовності термінатора, послідовності регуляції трансляції такі, як ділянки зв'язування рибосом та внутрішні ділянки зв'язування рибосом, енхансери, сайленсери, інсулятори, граничні елементи, точка початку реплікації, сайти прикріплення до матриксу та ділянки контролю локусів.

"Експресія гена" відноситься до перетворення інформації, що міститься в гені, на продукт гена. Продукт гена може являти собою безпосередній продукт транскрипції гена (наприклад, мРНК, тРНК, рРНК, антисмислова РНК, рибозим, структурна РНК або РНК будь-якого іншого типу) або білок, який одержують за допомогою трансляції мРНК. Продукти генів також включають РНК, що є модифікованою при використанні таких процесів, як кепування, поліаденілування, метилування та редагування, а білки піддаються модифікації наприклад, шляхом метилування, ацетилування, фосфорилювання, убіквітинілування, АДФ-рибозилювання, міристилювання та глікозилювання.

"Модулювання" експресії гена відноситься до зміни активності гена. Модулювання експресії може включати, але без обмеження такими, як активація генів та репресія генів.

"Трансгенний селективний маркер" відноситься до екзогенної послідовності, що включає маркерний ген, оперативно зв'язаний з промотором та 3'-UTR, для включення експресійної касети химерного гена. Необмежувальні приклади трансгенних селективних маркерів включають маркери толерантності до гербіцидів, стійкості до антибіотиків та візуальні репортерні маркери. Трансгенний селективний маркер може бути інтегрований разом з донорною послідовністю шляхом націленої інтеграції. Як такий, трансгенний селективний маркер експресує продукт, що використовується для оцінки інтеграції донора. На противагу до цього, способи та композиції, описані в даній заявці, дозволяють здійснювати інтеграцію будь-якої донорної послідовності без необхідності сумісної інтеграції трансгенного селективного маркера, наприклад, при використанні донора, який піддає мутації ендогенний ген, в який він інтегрує для одержання селективного маркера (тобто, селективний маркер, як використовується у цьому випадку не є трансгенним) з ендогенного локуса-мішені. Необмежувальні приклади

селективних маркерів включають маркери толерантності до гербіцидів, включаючи мутований AHAS ген, як описується в даній заявці.

"Рослинні" клітини включають, але без обмеження такими, як клітини односім'ядольних (однодольних) або двосім'ядольних (дводольних) рослин. Необмежувальні приклади однодольних рослин включають злакові рослини, такі як кукурудза, рис, ячмінь, овес, пшениця, сорго, жито, цукрова тростина, ананас, цибуля, банан та кокос. Необмежувальні приклади дводольних рослин включають тютюн, помідор, соняшник, бавовник, цукровий буряк, картоплю, салат-латук, диню, сою, канолу (ріпак) та люцерну.

Рослинні клітини можуть походити з будь-якої частини рослини та/або з будь-якої стадії розвитку рослини.

"Ділянка, яка представляє інтерес" являє собою будь-яку ділянку клітинного хроматину, наприклад, таку як ген або некодуюча послідовність в гені або поряд з геном, з якою бажано зв'язувати екзогенну молекулу. Зв'язування можна проводити з метою направленого розщеплення ДНК та/або націленої рекомбінації. Ділянка, яка представляє інтерес, може знаходитися у хромосомі, епісомі, геномі органели (наприклад, мітохондрії, хлоропласті) або в інфекційному вірусному геномі. Ділянка, яка представляє інтерес, може знаходитися в кодуючій ділянці гена, в транскрибованих некодуючих ділянках, наприклад, таких як лідерні послідовності, трейлерні послідовності або інтрони, або в нетранскрибованих ділянках, вище або нижче від кодуючої ділянки. Ділянка, яка представляє інтерес, може бути наскільки малою як одна нуклеотидна пара, або може складати аж до 2000 пар нуклеотидів у довжину, або мати довжину, що являє собою ціле значення кількості пар нуклеотидів.

Терміни "функціональний зв'язок" та "функціонально зв'язаний" використовують почергово стосовно безпосередньої близькості двох або більше компонентів (таких, як елементи послідовності), в яких компоненти розташовані так, що обидва компоненти нормально функціонують і допускають можливість того, що принаймні один з компонентів може опосередковувати функцію, що виконується принаймні одним з інших компонентів. Наприклад, послідовність регуляції транскрипції така, як промотор, є функціонально зв'язаною з кодуючою послідовністю, якщо послідовність регуляції транскрипції контролює рівень транскрипції кодуючої послідовності у відповідь на присутність або відсутність одного або декількох факторів регуляції транскрипції. Послідовність регуляції транскрипції, як правило, є функціонально зв'язаною з кодуючою послідовністю у цис-положенні, але не обов'язково безпосередньо межує з нею. Наприклад, енхансер являє собою послідовність регуляції транскрипції, яка є функціонально зв'язаною з кодуючою послідовністю, навіть якщо вони не є суміжними.

Відносно злитих поліпептидів термін "функціонально зв'язаний" може відноситися до факту того, що кожний з компонентів виконує в зв'язку з іншим компонентом ту ж саму функцію, яку б він виконував, якби вони не були зв'язані. Наприклад, відносно злитого поліпептиду, в якому ДНК-зв'язувальний домен ZFP є злитим з регуляторним доменом, ДНК-зв'язувальний домен (ZFP, TALE) є злитим з доменом розщеплення (наприклад, доменом ендонуклеази таким, як FokI, доменом мегануклеази, тощо), ДНК-зв'язувальний домен та домен розщеплення знаходяться в оперативному зв'язку, якщо у злитому поліпептиді частина ДНК-зв'язувального домена є здатною до зв'язування зі своїм сайтом-мішенню та/або із сайтом свого зв'язування, у той час, як домен розщеплення (нуклеази) є здатним розщеплювати ДНК поблизу сайта-мішені. Домен нуклеази може також демонструвати здатність до зв'язування ДНК (наприклад, нуклеаза, злита з доменом ZFP або TALE, що також може зв'язуватися з ДНК). Подібного до цього, стосовно злитого поліпептиду, в якому ДНК-зв'язувальний домен є злитим з доменом активації або репресії, ДНК-зв'язувальний домен, домен активації або репресії є оперативно зв'язаними, якщо у злитому поліпептиді частина ДНК-зв'язувального домена є здатною до зв'язування із своїм сайтом-мішенню та/або із сайтом свого зв'язування, у той час, як домен активації є здатним до підвищення експресії гена або домен репресії є здатним до зниження експресії гена.

"Функціональний фрагмент" білка, поліпептиду або нуклеїнової кислоти являє собою білок, поліпептид або нуклеїнову кислоту, послідовність яких не є ідентичною такій повнорозмірного білка, поліпептиду або нуклеїнової кислоти, але при цьому зберігає ту ж саму функцію, що й повнорозмірний білок, поліпептид або нуклеїнова кислота. Функціональний фрагмент може містити більше, менше або таку саму кількість залишків, що й відповідна природна молекула, та/або може містити одну або декілька замін амінокислот або нуклеотидів. Способи визначення функції нуклеїнових кислот (наприклад, кодуючої функції, здатності до гібридизації з іншою нуклеїновою кислотою) є добре відомими в даній галузі техніки. Подібного до цього, способи визначення функції білків є добре відомими. Наприклад, ДНК-зв'язувальну функцію поліпептиду можна визначати, наприклад, за допомогою зв'язування на фільтрі, зсуву електрофоретичної рухливості або за допомогою аналізів імунопреципітації. Розщеплення ДНК можна піддавати

аналізу за допомогою електрофорезу в гелі. Див. Ausubel та ін., вище. Здатність білка взаємодіяти з іншим білком можна визначати, наприклад, за допомогою коімунопреципітації, двогібридних аналізів або комплементації, як генетично, так і біохімічно. Див., наприклад, Fields та ін. (1989) Nature 340: 245-246; патент США № 5,585,245 та публікація заявки PCT WO 98/44350.

ДНК-зв'язувальні домени

Будь-який ДНК-зв'язувальний домен може використовуватися у способах, описаних в даній заявці. У деяких варіантах реалізації ДНК-зв'язувальний домен включає білок цинкових пальців. Домен цинкових пальців включає один або більше цинкових пальців (Miller та ін. (1985) EMBO J. 4:1609-1614; Rhodes (1993) Scientific American Feb.: 56-65; патент США № 6453242). Зв'язувальні домени цинкових пальців, описані в даній заявці, в загальному випадку включають 2, 3, 4, 5, 6 або навіть більше цинкових пальців.

Як правило, довжина одного домену цинкових пальців складає приблизно 30 амінокислот. Структурні дослідження продемонстрували, що кожний домен цинкових пальців (мотив) містить дві бета-складки (що утримуються в положенні бета-вигину, який містить два інваріантні залишки цистеїну) та альфа-спіраль (що містить два інваріантних залишки гістидину), які утримуються в конкретній конформації за допомогою координаційних взаємодій двох цистеїнів та двох гістидинів з атомом цинку.

Цинкові пальці включають канонічні цинкові пальці C_2H_2 (тобто, цинкові пальці, в яких іон цинку є координованим двома залишками цистеїну та двома залишками гістидину) та неканонічні цинкові пальці, наприклад, такі як цинкові пальці C_3H (тобто такі, в яких іон цинку є координованим трьома залишками цистеїну та двома залишками гістидину), а також C_4 цинкові пальці (в яких іон цинку є координованим чотирма залишками цистеїну). Див також публікацію WO 02/057293, а також публікацію патентної заявки США №20080182332, що відноситься до неканонічних ZFP для застосування у рослинах.

Зв'язувальний домен цинкових пальців може мати нову специфічність зв'язування. Способи конструювання включають, але без обмеження такими, раціональне конструювання та різні типи селекції. Раціональне конструювання включає, наприклад, використання баз даних, що містять триплетні (або квадруплетні) нуклеотидні послідовності та конкретні амінокислотні послідовності цинкових пальців, в яких кожна триплетна або квадруплетна нуклеотидна послідовність є асоційованою з однією або декількома амінокислотними послідовностями цинкових пальців, які зв'язуються з конкретною триплетною або квадруплетною послідовністю.

Типові способи селекції, включаючи фаговий дисплей та двогібридні системи, описані в патентах США №№5789538; 5925523; 6007988; 6013453; 6410248; 6140466; 6200759 і 6242568; а також WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 та GB 2338237.

Підвищення специфічності зв'язування зв'язувальних доменів цинкових пальців описане, наприклад, у патенті, США № 6794136.

Оскільки окремий цинковий палець зв'язується з послідовністю, що складається з трьох нуклеотидів (тобто, триплетом) (або послідовністю з чотирьох нуклеотидів, яка може перекриватися по одному нуклеотиду з ділянкою зв'язування з чотирьох нуклеотидів сусіднього цинкового пальця), довжина послідовності, з якою повинен зв'язуватися сконструйований зв'язувальний домен цинкових пальців (наприклад, послідовності-мішені), визначається кількістю цинкових пальців у сконструйованому зв'язувальному домені цинкових пальців. Наприклад, для ZFP, в яких мотиви з цинковими пальцями не зв'язуються з субсайтами, що перекриваються, послідовність-мішень з шести нуклеотидів є зв'язаною зв'язувальним доменом з двома пальцями; послідовність-мішень з дев'яти нуклеотидів є зв'язаною зв'язувальним доменом з трьома пальцями і т. д. Як вказано в даній заявці, сайти зв'язування для окремих цинкових пальців (тобто, субсайти) у сайті-мішені не обов'язково повинні бути суміжними, але можуть бути розділені одним або декількома нуклеотидами в залежності від довжини та природи амінокислотних послідовностей між цинковими пальцями (тобто, лінкерів між пальцями) у зв'язувальному домені з декількома пальцями.

У зв'язувальному домені цинкових пальців з декількома пальцями сусідні цинкові пальці можуть бути розділені амінокислотними лінкерними послідовностями, що складаються приблизно з 5 амінокислот (так звані "канонічні" лінкери між пальцями), або, альтернативно, одним або декількома неканонічними лінкерами. Див., наприклад, патенти США 6453242 та 6534261. Для сконструйованих зв'язувальних доменів цинкових пальців, що містять більше трьох пальців, бажаною може бути інсерція між певними цинковими пальцями більш довгих ("неканонічних") лінкерів між пальцями, оскільки вона може збільшити афінність та/або специфічність зв'язування зв'язувального домену. Див., наприклад, патент США № 6479626 та WO 01/53480. Таким чином, зв'язувальні домени цинкових пальців з декількома пальцями також

можуть бути охарактеризовані відносно присутності та положення неканонічних лінкерів між пальцями. Наприклад, зв'язувальний домен цинкових пальців з шістьма пальцями, що містить три пальці (з'єднані двома канонічними лінкерами між пальцями), довгий лінкер та три додаткових пальці (з'єднані двома канонічними лінкерами між пальцями) позначається як конфігурація 2×3. Подібно до цього, зв'язувальний домен, що містить два пальці (з канонічним лінкером між ними), довгі лінкери та два додаткових пальці (з'єднані канонічним лінкером), позначається як білок 2×2. Білок, що містить три одиниці з двома пальцями (в кожній з яких два пальці є з'єднаними канонічним лінкером) і в якому кожна одиниця з двома пальцями є з'єднаною з сусідніми одиницями з двома пальцями довгим лінкером, позначається як конфігурація 3×2.

Присутність у зв'язувальному домені з декількома пальцями між двома сусідніми цинковими пальцями довгого або неканонічного лінкера між пальцями часто дозволяє двом пальцям зв'язуватися з субсайтами, які не є безпосередньо суміжними у послідовності-мішені. Таким чином, між субсайтами сайті-мішені можуть існувати пробіли (гепи) в один або декілька нуклеотидів; наприклад, сайт-мішень може містити один або декілька нуклеотидів, які не контактують з цинковим пальцем. Наприклад, зв'язувальний домен цинкових пальців 2×2 може зв'язуватися з двома послідовностями із шести нуклеотидів, розділених одним нуклеотидом, тобто він зв'язується з сайтом-мішенню із 13 нуклеотидів. Також див. Moore та ін. (2001a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:1432-1436; Moore та ін. (2001b) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 1437- 1441 і WO 01/53480.

Як обговорювалося раніше, субсайт-мішень являє собою послідовність з трьох або чотирьох нуклеотидів, яка зв'язується одним цинковим пальцем. Для деяких цілей одиницю з двома пальцями позначають як зв'язувальний модуль. Зв'язувальний модуль можна одержувати, наприклад, шляхом селекції двох сусідніх пальців у контексті білка з декількома пальцями (як правило, з трьома пальцями), який зв'язує певну послідовність-мішень із шести нуклеотидів. Альтернативно, модулі можна конструювати шляхом поєднання індивідуальних цинкових пальців. Див. також WO 98/53057 та WO 01/53480.

Альтернативно, ДНК-зв'язувальний домен може мати походження від нуклеази. Наприклад, є відомими послідовності, що розпізнають хомінг-ендонуклеази та мегануклеази, такі як I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII та I-TevIII. Див. також патент США № 5420032; патент США № 6833252; Belfort та ін. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388; Dujon та ін. (1989) Gene 82:115-118; Perler та ін. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127; Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228; Gimble та ін. (1996) J. Mol. Biol. 263: 163-180; Argast та ін. (1998) J. Mol. Biol. 280: 345-353 та каталог New England Biolabs. Крім того, ДНК-зв'язувальну специфічність хомінг-ендонуклеаз та мегануклеаз можна застосовувати у конструюванні для зв'язування неприродних сайтів-мішеней. Див., наприклад, Chevalier та ін. (2002) Molec. Cell 10: 895-905; Epinat та ін. (2003) Nucleic Acids Res. 31: 2952-2962; Ashworth та ін. (2006) Nature 441: 656-659; Paques та ін. (2007) Current Gene Therapy 7: 49-66; публікація патентної заявки США № 20070117128. ДНК-зв'язувальні домени хомінг ендонуклеаз та мегануклеаз можуть піддаватися змінам у контексті нуклеази у цілому (тобто так, що нуклеаза включає споріднений домен розщеплення) або можуть бути злитими з гетерологічним ДНК-зв'язувальним доменом, (наприклад, білком "цинкових пальців" або TALE) або з гетерологічним доменом розщеплення. ДНК-зв'язувальні домени, які мають походження від мегануклеази, можуть також демонструвати ДНК-зв'язувальну активність.

В інших варіантах здійснення ДНК-зв'язувальний домен містить природний або сконструйований (неприродний) ДНК-зв'язувальний домен TAL-ефектора. Див. наприклад, патент США № 8,586,526, що є введеним у дану заявку як посилання у своїй цілісності. Патогенні для рослин бактерії роду Xanthomonas є відомими як такі, що викликають ряд захворювань у важливих сільськогосподарських культурах. Патогенність Xanthomonas залежить від консервативної системи секреції типу III (T3S), що вводить у рослинну клітину більше 25 різних ефекторних білків. Серед таких білків, що вводяться, є подібні до активаторів транскрипції (TAL) ефектори, які імітують активатори транскрипції рослин та управляють транскриптомом рослин (див. Kay та ін. (2007) Science 318: 648-651). Ці білки містять ДНК-зв'язувальний домен та домен активації транскрипції. Одним з найбільш охарактеризованих TAL-ефекторів є AvrBs3 з Xanthomonas campestgris pv. Vesicatoria (див. Bonas та ін. (1989) Mol Gen Genet 218:127-136 та WO2010079430). TALE містить централізований домен з тандемних повторів, де кожний повтор включає приблизно 34 амінокислоти, які є ключовими для специфічності зв'язування ДНК цими білками. Крім того, вони містять послідовність ядерної локалізації та кислотний домен активації транскрипції (для огляду див. Schornack S, та ін. (2006) J. Plant Physiol. 163(3): 256-272). Крім того, у фітопатогенних бактеріях Ralstonia solanacearum у

біоварі 1 штаму GMI1000 та у біоварі 4 штаму RS1000 R. solanacearum були знайдені два гени, що позначаються як brg11 та hpx17, гомологічні родині AvrBs3 Xanthomonas (див. Heuer та ін. (2007) Appl. and Envir. Micro 73(13): 4379-4384). Ці гени на 98,9 % є ідентичними за нуклеотидною послідовністю один одному, але відрізняються делецією 1575 п. н. у домені hpx17 з повторами. Проте обидва продукти генів мають менше ніж 40% ідентичності послідовності з родиною білків AvrBs3 Xanthomonas.

Таким чином у деяких варіантах реалізації ДНК-зв'язувальний домен, що зв'язується з сайтом-мішенню у цільовому локусі, являє собою сконструйований домен з TAL ефектором, подібним до того, що має походження від рослинних патогенів Xanthomonas (див. Boch та ін., (2009) Science 326: 1509-1512 та Moscou і Bogdanove, (2009) Science 326: 1501) та Ralstonia (див. Heuer та ін. (2007) Applied and Environmental Microbiology 73(13): 4379-4384); патенти США №№ 8,586,526; 8,420,782 та 8,440,431. TALEN можуть включати С-кеп та/або N-кеп послідовності (наприклад, С-термінальне та/або N-термінальне вкорочення TALE скелету (наприклад, "+17", "+63" С-кепи). Див., наприклад, патент США № 8,586,526.

Як інша альтернатива, ДНК-зв'язувальний домен може мати походження від білка лейцинової застібки. Лейцинові застібки являють собою клас білків, які є залученими у білок-білкову взаємодію у багатьох еукаріотичних регуляторних білках, що є важливими транскрипційними факторами, асоційованими з експресією генів. Лейцинові застібки відносяться до спільного структурного мотиву у цих транскрипційних факторах у декількох царствах, включаючи тварин, рослини, дріжджі, тощо. Лейцинова застібка утворюється двома поліпептидами (гомодимер та гетеродимер, що зв'язуються зі специфічними ДНК послідовностями у спосіб, коли залишки лейцину є рівномірно розподіленими в α-спіралі, так, що залишки лейцину двох поліпептидів закінчуються на тій самій стороні спіралі. Специфічність зв'язування ДНК лейцинових застібок може використовуватися у ДНК-зв'язувальних доменах, що надають зв'язують ДНК, розкритих в даній заявці

Домени розщеплення

Як було зазначено вище, ДНК-зв'язувальний домен також можна зв'язувати з доменом розщеплення (нуклеазою). Наприклад, хомінг-ендонуклеази можуть бути модифіковані стосовно їх специфічності зв'язування ДНК, при збереженні функції нуклеазни. Крім того, білки з цинковими пальцями також можна зливати з доменом розщеплення з утворенням нуклеаз з цинковими пальцями (ZFN). TALE білки можуть зв'язуватися з доменом нуклеази (розщеплення) з утворенням TALEN.

Частина домену розщеплення злитих білків, що описуються в даній заявці, може бути одержана з будь-якої ендонуклеази або екзонуклеази. Типові ендонуклеази, з яких можна отримувати домен розщеплення, включають, але без обмеження, рестрикційні ендонуклеази та хомінг-ендонуклеази. Див., наприклад, Каталог 2002-2003, New England Biolabs, Beverly, MA; та Belfort та ін. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3379-3388. Є відомими додаткові ферменти, що розщеплюють ДНК (наприклад, нуклеаза S1; нуклеаза бобів мунг; панкреатична ДНКаза I; нуклеаза мікроків; дріжджова ендонуклеаза HO; також див. Linn та ін. (ред.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). Необмежувальні приклади хомінг ендонуклеаз та мегануклеаз, що включають I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII та I-TevIII, є відомими. Див. також патент США № 5,420,032; патент США № 6,833,252; Belfort та ін. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3379–3388; Dujon та ін. (1989) Gene 82:115–118; Perler та ін. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125–1127; Jasin (1996) Trends Genet. 12:224–228; Gimble та ін. (1996) J. Mol. Biol. 263:163–180; Argast та ін. (1998) J. Mol. Biol. 280: 345–353 та каталог New England Biolabs. Один або декілька з цих ферментів (або їх функціональні фрагменти) можна використовувати як джерела доменів розщеплення та напівдоменів розщеплення.

Рестрикційні ендонуклеази (рестрикційні ферменти) існують у багатьох видів та здатні до специфічного для послідовності зв'язування з ДНК (у сайті впізнання) та розщеплення ДНК у сайтах зв'язування або поруч з ним. Певні рестрикційні ферменти (наприклад, типу IIS) розщеплюють ДНК у сайтах, віддалених від сайту розпізнавання, та містять розділені домени зв'язування та розщеплення. Наприклад, фермент типу IIS FokI каталізує дволанцюгове розщеплення ДНК, у сайті, що є віддаленим на 9 нуклеотидів від його сайту розпізнавання, на одному ланцюзі, та на 13 нуклеотидів від його сайту розпізнавання на іншому. Див., наприклад, патенти США №№ 5356802; 5436150 та 5487994; а також Li та ін. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279; Li та ін. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2764-2768; Kim та ін. (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 883-887; Kim та ін. (1994b) J. Biol. Chem. 269: 31978-31982. Таким чином, в одному з варіантів здійснення злиті білки містять домен розщеплення (або напівдомен розщеплення) з принаймні одного рестрикційного ферменту типу IIS та один або більше

зв'язувальних доменів цинкових пальців, які можуть бути такими, що сконструйовані або не сконструйованими.

Типовий рестрикційний фермент типу IIS, домен розщеплення якого знаходиться окремо від зв'язувального домену, являє собою FokI. Цей конкретний фермент є активним як димер. Bitinaite та ін. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10570-10575. У відповідності із цим, для цілей даного опису частину ферменту FokI, що використовується у розкритих злитих білках, розглядають як напівдомен розщеплення. Таким чином, для направленого дволанцюгового розщеплення та/або направленого заміщення клітинних послідовностей при використанні злиттів "цинкові пальці"-FokI можна використовувати два злитих білки, де кожний містить напівдомен розщеплення FokI, для відновлення каталітично активного домену розщеплення Альтернативно, також можна використовувати одну поліпептидну молекулу, що містить зв'язувальний домен цинкових пальців та два напівдомени розщеплення FokI. Параметри для направленого розщеплення та направленої зміни послідовності при використанні злиттів "цинкові пальці"-FokI приводяться в іншій частині даного опису.

Домен розщеплення або напівдомен розщеплення може являти собою будь-яку частину білка, що зберігає розщеплювальну активність або зберігає здатність до мультимеризації (наприклад, димеризації) з формуванням функціонального домену розщеплення.

Типові рестрикційні ферменти типу IIS є описаними в міжнародній публікації WO 07/014275, що є введеною в дану заявку як посилання у своїй цілісності.

Для поліпшення специфічності розщеплення домени розщеплення можуть також бути модифіковані. У деяких варіантах реалізації використовуються ці варіанти напівдоменів розщеплення для мінімізації або запобігання гомодимеризації напівдоменів розщеплення. Амінокислотні залишки у положеннях 446, 447, 479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 531, 534, 537 та 538 FokI усі являють собою мішені для впливу на димеризацію напівдоменів розщеплення FokI. Необмежувальні приклади таких модифікованих напівдоменів розщеплення описані більш детально у патентах США №№ 7,888,121; 7,914,796 та 8,034,598, що є введеними у дану заявку як посилання. Див. також розділ "Приклади".

Додаткові сконструйовані напівдомени розщеплення FokI, що формують облігатні гетеродимери, можуть також використовуватися у ZFN, що описуються в даній заявці. Додаткові сконструйовані напівдомени розщеплення FokI, що формують облігатні гетеродимери, включають пару, в якій перший напівдомен розщеплення включає мутації в амінокислотних залишках в положеннях 490 та 538 FokI, а другий напівдомен розщеплення містить мутації в амінокислотних залишках 486 та 499.

Таким чином, у певних варіантах здійснення мутація в положенні 490 замінює Glu (E) на Lys (K); мутація в 538 замінює Iso (I) на Lys (K); мутація в 486 замінює Gln (Q) на Glu (E); а мутація в положенні 499 замінює Iso (I) на Lys (K). Зокрема, сконструйовані напівдомени розщеплення, що описуються в даній заявці, отримували шляхом введення мутацій в положення 490 (E→K) та 538 (I→K) в одному з напівдоменів розщеплення з отриманням сконструйованого напівдомену розщеплення, що позначається як "E490K:I538K", і за допомогою введення мутацій у положення 486 (Q→E) та 499 (I→L) в іншому напівдомені розщеплення з отриманням сконструйованого напівдомену розщеплення, що позначається як "Q486E:I499L". Сконструйовані напівдомени розщеплення, що описуються в даній заявці, є облігатними мутантними гетеродимерами, в яких аберантне розщеплення мінімізоване або усунене. Див., наприклад, патенти США №№ 7,914,796 та 8,034,598, розкриття яких є введеним у дану заявку як посилання для всіх цілей. У певних варіантах здійснення винаходу сконструйований напівдомен розщеплення містить мутації в положеннях 486, 499 та 496 (що нумеруються відносно FokI дикого типу), наприклад, мутації, які замінюють залишок дикого типу Gln (Q) в положенні 486 на залишок Glu (E), залишок дикого типу Iso (I) в положенні 499 на залишок Leu (L) та залишок дикого типу Asn (N) в положенні 496 на Asp (D) або залишок Glu (E) (що також позначаються як домени "ELD" та "ELE", відповідно). В інших варіантах здійснення сконструйований напівдомен розщеплення містить мутації в положеннях 490, 538 та 537 (що нумеруються відносно FokI дикого типу), наприклад, мутації, які замінюють залишок дикого типу Glu (E) в положенні 490 на залишок Lys (K), залишок дикого типу Iso (I) в положенні 538 на залишок Lys (K) та залишок дикого типу His (H) в положенні 537 на залишок Lys (K) або залишок Arg (R) (що також позначаються як домени "KKK" та "KKR", відповідно). В інших варіантах здійснення сконструйований напівдомен розщеплення містить мутації в положеннях 490 та 537 (що нумеруються відносно FokI дикого типу), наприклад, мутації, які замінюють залишок дикого типу Glu (E) в положенні 490 на залишок Lys (K) і залишок дикого типу His (H) в положенні 537 на залишок Lys (K) або залишок Arg (R) (що також позначаються як домени "KIK" та "KIR", відповідно). (Див. публікацію патентної заявки США № 61/337769, що подана 8 лютого 2010 року). В інших варіантах

здійснення сконструйований напівдомен розщеплення містить "Sharkey" та/або мутації "Sharkey'" (див. Guo та ін. (2010) J. Mol. Biol. 400(1): 96-107).

Сконструйовані напівдомени розщеплення, що описуються в даній заявці, можна отримувати будь-яким прийнятним способом, наприклад, за допомогою сайт-специфічного мутагенезу напівдоменів розщеплення дикого типу (FokI), як описується у патентах США №№ 7,914,796; 8,034,598 та 8,623,618; та публікації патентної заявки США № 20110201055.

В інших втіленнях нуклеаза включає сконструйований ДНК-зв'язувальний домен TALE та домен нуклеази (наприклад, домен ендонуклеази та/або мегануклеази), що також називаються як TALEN. Способи та композиції для конструювання таких TALEN білків для сильної, сайт-специфічної взаємодії з послідовністю-мішенню, що є вибраною користувачем, були опубліковані (див. патент США № 8,586,526). У деяких варіантах здійснення TALEN включає домен розщеплення ендонуклеази (наприклад, FokI) або напівдомен розщеплення. В інших варіантах здійснення TALE-нуклеаза являє собою мега TAL. Такі мега TAL нуклеази являють собою злиті білки, що включають ДНК-зв'язувальний домен TALE та домен розщеплення мегануклеази. Домен розщеплення мегануклеази є активним як мономер та не вимагає димеризації для своєї активності. (Див. Boissel та ін., (2013) Nucl Acid Res: 1-13, doi: 10.1093/nar/gkt1224). Крім того, домен нуклеази може також демонструвати ДНК-зв'язувальну функціональність.

У додаткових варіантах реалізації нуклеаза включає компактний TALEN (cTALEN). Такі конструкції являють собою одноланцюгові злиті білки, що зв'язують ДНК-зв'язувальний домен TALE з доменом TevI нуклеази. Злитий білок може функціонувати або як ніказа, локалізована ділянкою TALE, або може створювати розрив подвійного ланцюга, у залежності від того, де розташований ДНК-зв'язувальний домен TALE стосовно домена TevI нуклеази (див. Beurdeley та ін. (2013) Nat Comm: 1-8 DOI: 10.1038/ncomms2782). Будь-який TALEN може використовуватися у комбінації з додатковими TALEN (наприклад, одним або більше TALEN (cTALEN або FokI-TALEN) з однією або більше мега-TAL).

Нуклеази можуть поєднуватися при використанні стандартних методик, включаючи такі in vivo у сайті-мішені нуклеїнової кислоти при використанні методики так званого "розщепленого ферменту" (див., напиклад, публікацію патентної заявки США № 20090068164). Компоненти таких розщеплених ферментів можуть піддаватися експресії або в окремих експресійних конструкціях, або можуть бути зв'язаними в одній відкритій рамці зчитування, де індивідуальні компоненти є відокремленими, наприклад, за допомогою саморозщеплюваного 2A пептиду або IRES послідовості. Компоненти можуть являти собою індивідуальні зв'язувальні домени "цинкових пальців" або зв'язувальний домен нуклеїнової кислоти доменів мегануклеази.

Нуклеази можуть піддаватися скринінгу на активність перед застосуванням, наприклад, у системі хромосом на основі дріжджів, як описується у патенті США № 8,563,314. Конструкції для експресії нуклеази можуть буди легко сконструйовані при використанні способів, які є відомими у галузі техніки. Див., наприклад, публікації патентних заявок США №№ 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060188987; 20060063231; та міжнародну публікацію WO 07/014275. Експресія нуклеази може відбуватися під контролем конститутивного промотора або індуцибельного промотора, наприклад, промотора галактокінази, який активується (піддається дерепресії) у присутності рафінози та/або галактози та піддається репресії у присутності глюкози.

У деяких варіантах реалізації нуклеаза систему CRISPR/Cas. CRISPR (короткі поліндромні повтори, що розміщуються регулярними групами) локус, який кодує РНК компоненти системи, та cas (CRISPR-асоційований) локус, який кодує білки (Jansen та ін., 2002. Mol. Microbiol. 43: 1565-1575; Makarova та ін., 2002. Nucleic Acids Res. 30: 482-496; Makarova та ін., 2006. Biol. Direct 1: 7; Haft та ін., 2005. PLoS Comput. Biol. 1: e60), які укладають генні послідовності нуклеазної системи CRISPR/Cas. CRISPR локуси у мікробних клітинах містять комбінацію CRISPR-асоційованих (Cas) генів, а також некодуючих елементів РНК, які є здатними програмувати специфічність опосередкованого CRISPR розщеплення нуклеїнової кислоти.

CRISPR типу II являє собою одну з найбільш охарактеризованих систем та здійснює направлений розрив дволанцюгової ДНК у чотири етапи. На першому етапі дві некодуючі РНК, набір пре-crРНК та tracrРНК піддають транскрипції з CRISPR локусу. На другому етапі tracrРНК гібридизується з ділянками повторів пре-crРНК та опосередковує процесинг пре-crРНК у зрілі crРНК, що містять індивідуальні спейсерні послідовності. На третьому етапі комплекс зріла crРНК:tracrРНК направляє Cas9 на ДНК-мішень при використанні спарювання основ Уотсона-Кріка між спейсером на crРНК та протоспейсером на ДНК-мішені після суміжного мотиву протоспейсера (PAM), що є додатковою вимогою для цільового впізнання. На завершення Cas9 опосередковує розщеплення ДНК-мішені з утворенням розриву дволанцюгової ДНК у межах

протоспейсера. Активність системи CRISPR/Cas складається з трьох етапів: (i) інсерція чужорідної послідовності ДНК у CRISPR матрицю для того, щоб запобігти майбутнім атакам у процесі, який називається ‘адаптацією’, (ii) експресія релевантних білків, а також експресія та процесинг матриці, після чого здійснюють (iii) опосередковану РНК інтерференцію із чужорідної нуклеїнової кислотою. Таким чином, у бактеріальній клітині кілька так званих ‘Cas’ білків є залученими у природну функцію системи CRISPR/Cas та виконують певні ролі у функціях таких, як інсерція чужорідної ДНК, тощо.

У деяких варіантах реалізації Cas білок може являти собою "функціональну похідну" існуючого у природі Cas білка. "Функціональна похідна" природної послідовності поліпептиду являє собою сполуку, яка володіє якісною біологічною властивістю, що є спільною з нативною послідовністю поліпептиду. "Функціональні похідні" включають, але не обмежуються такими, як фрагменти нативної послідовності та похідні нативної послідовності поліпептиду та їх фрагменти, за умови, що вони мають біологічну активність, яка є спільною з відповідною нативною послідовністю поліпептиду. Біологічна активність, яка передбачається в даній заявці, являє собою здатність функціональної похідної гідролізувати ДНК субстрат з утворенням фрагментів. Термін "похідна" охоплює як варіанти амінокислотних послідовностей поліпептиду, так і ковалентні модифікації та їх злиті форми. Прийнятні похідні поліпептиду Cas або його фрагменту, включають, але не обмежуються такими, як мутанти, злиті продукти, ковалентні модифікації Cas білка або його фрагменту. Cas білок, який включає Cas білок або його фрагмент, а також похідні Cas білка або його фрагментів, може бути отриманий з клітини або синтезований хімічно або шляхом комбінації цих двох процедур. Клітина може являти собою клітину, що природно продукує Cas білок, або клітину, яка природно продукує Cas білок та є генетично сконструйованою для продукції ендогенного Cas білка при більш високому рівні експресії або для отримання білка Cas з екзогенно введеної нуклеїнової кислоти, де нуклеїнова кислота кодує Cas білок, що є таким самим або відмінним від ендогенного Cas білка. У деяких випадках клітина природно не виробляє Cas білка та є генетично сконструйованою для продукції білка Cas. Див. наприклад, попередню заявку США 61/823,689.

Таким чином, нуклеаза включає ДНК-зв’язувальний домен, що специфічно зв’язується з сайтом-мішенню у будь-якому гені у комбінації з доменом нуклеази, що розщеплює ДНК у сайті зв’язування або поряд з ним.

Злиті білки

Способи створення та конструювання злитих білків (та полінуклеотидів, що їх кодують) є відомими фахівцям в даній галузі техніки. Наприклад, способи створення та конструювання злитих білків, що включають ДНК-зв’язувальні домени (наприклад, домени цинкових пальців, TALE) та регуляторні домени або домени розщеплення (або напівдомени розщеплення), а такод полінуклеотидів, які кодують такі злиті білки, є описаними у патентах США №№ 8,586,526; 8,592,645; 8,399,218; 8,329,986; 7,888,121; 6,453,242; та 6,534,261 та публікації патентної заявки США № 2007/0134796, що є введеними у дану заявку як посилання у своїй цілісності. У деяких варіантах здійснення конструюють полінуклеотиди, що кодують злиті білки. Ці полінуклеотиди можуть бути вбудовані у вектор, а вектор може вводитися у клітину (див. нижче для додаткового розкриття стосовно векторів та способів введення полінуклеотидів у клітини).

У деяких варіантах здійснення способів, що описуються в цьому документі, нуклеази з цинковими пальцями або TALEN містять злитий білок, що включає зв’язувальний домен цинкових пальців або ДНК-зв’язувальний домен TALE та домен нуклеази (наприклад, рестрикційний фермент типу IIS та/або домен мегануклеази). У деяких варіантах реалізації ZFN або TALEN включають напівдомен розщеплення з рестрикційного ферменту FokI, та два таких злитих білка експресуються у клітині. TALEN та напівдомен розщеплення з рестрикційного ферменту FokI, та два такі білки експресуються у клітині. Експресія двох злитих білків у клітині може бути результатом доставки в клітину двох білків; доставки в клітину одного білка і однієї нуклеїнової кислоти, що кодує один з білків; доставки у клітину двох нуклеїнових кислот, кожна з яких кодує один з білків; або доставки у клітину однієї нуклеїнової кислоти, що кодує обидва білки. У додаткових варіантах реалізації злитий білок включає один поліпептидний ланцюг, що містить два напівдомени розщеплення та зв’язувальний домен цинкових пальців або зв’язувальний домен TALE. У цьому випадку в клітині експресується один злитий білок та, не маючи бажання бути пов’язаним теорією, вважають, що він розщеплює ДНК в результаті утворення внутрішньомолекулярного димера напівдоменів розщеплення.

У деяких варіантах реалізації компоненти злитих білків (наприклад, продукт злиття ZFP-FokI) розташовані так, що домен цинкових пальців розташований ближче до амінотермінального кінця злитого білка, а напівдомен розщеплення розташований ближче до карбокситермінального кінця. Це є дзеркальним відображенням відносної орієнтації домену

розщеплення у існуючих у природі доменах розщеплення, таких, як ті, що мають походження від ферменту FokI, в якому ДНК-зв'язувальний домен розташований ближче до амінотермінального кінця, а напівдомен розщеплення розташований ближче до карбокситермінального кінця. У цих варіантах здійснення димеризація напівдоменів розщеплення з формуванням функціональної нуклеази зумовлена зв'язуванням злитих білків з сайтами на протилежних ланцюгах ДНК, де 5'-кінці сайтів зв'язування розташовані проксимально один відносно одного.

У додаткових варіантах здійснення компоненти злитих білків (наприклад, продукт злиття ZFP-FokI) розташовані так, що напівдомен розщеплення є розташованим ближче до амінотермінального кінця злитого білка, а домен цинкових пальців є розташованим ближче до карбокситермінального кінця. У цих варіантах димеризація напівдоменів розщеплення з утворенням функціональної нуклеази зумовлена зв'язуванням злитих білків з сайтами на протилежних ланцюгах ДНК, де 3'-кінці сайтів зв'язування розташовані проксимально один відносно одного.

У додаткових варіантах реалізації перший злитий білок містить напівдомен розщеплення, що розташований ближче до амінотермінального кінця злитого білка, та домен "цинкових пальців", що розташований найближче до карбокситермінально кінця, а другий злитий білок розміщується так, що домен "цинкових пальців" є найближчим до амінотермінального кінця злитого білка, а напівдомен розщеплення є найближчим до карбокситермінального кінця. У деяких варіантах здійснення обидва злиті білки зв'язуються з одним і тим самим ланцюгом ДНК, де сайт зв'язування першого злитого білка, який містить домен цинкових пальців, є ближчим до карбокситермінального кінця, розташованого з 5'-кінця сайта зв'язування другого злитого білка, що містить домен цинкових пальців, який є ближчим до амінотермінального кінця.

У деяких варіантах реалізації описаних злитих білків амінокислотна послідовність між доменом цинкових пальців і доменом розщеплення (або напівдоменом розщеплення) позначається як "ZC-лінкер". ZC-лінкер потрібно відрізняти від лінкерів між пальцями, описаних вище. Для подробиць див., наприклад, патент США № 7,888,12 для отримання ZC-лінкерів, що оптимізують розщеплення.

В одному з варіантів здійснення заявка забезпечує білок, який містить ZFN, що включає білок цинкових пальців, який має одну або більше амінокислотних послідовностей спіралі впізнання, що представлені у Таблиці 2 (наприклад, білок "цинкових пальців", що складається з компоненту доменів "цинкових пальців" зі спіралями впізнання, як показано в одному рядку Таблиці 2). В іншому варіанті здійснення у даній заявці забезпечується вектор експресії ZFN, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує ZFP, яка містить одну або більше спіралей впізнавання, представлених у Таблиці 3 або Таблиці 13.

Сайти-мішені

Розкриті способи та композиції включають злиті білки, що містять ДНК-зв'язувальний домен (наприклад, ZFP, TALE, тощо) та регуляторний домен або домен розщеплення (наприклад, нуклеази) (або напівдомен розщеплення), в яких ДНК-зв'язувальний домен шляхом зв'язування з послідовністю одного або більше рослинних генів у хроматині клітини індукує розщеплення та націлену інтеграцію однієї або більше екзогенних послідовностей (включаючи трансгени) поряд з послідовністю-мішенню.

Як вказано в іншій частині даного опису, ДНК-зв'язувальний домен може бути сконструйований для зв'язування практично з будь-якою бажаною послідовністю. Таким чином, після ідентифікації ділянки, яка представляє інтерес, що містить послідовність, в якій є бажаною регуляція, розщеплення або рекомбінація, один або більше ДНК-зв'язувальних доменів можуть бути сконструюваними для зв'язуванням з однією або більше послідовностями ділянки, що представляє інтерес. У деяких варіантах реалізації ДНК-зв'язувальний домен включає білок "цинкових пальців", що зв'язується з цільовим сайтом в одному або більше генах, як показано у Таблиці 3 або Таблиці 13.

Вибір сайту-мішені у геномній ділянці, яка представляє інтерес, в клітинному хроматині будь-якого гена для зв'язування при використанні ДНК-зв'язувального домена (наприклад, сайту-мішені) можна проводити, наприклад, при використанні способів, описаних у патенті США № 6453242. Спеціалістам у даній галузі техніки буде зрозумілим, що для вибору сайту-мішені також можна використовувати простий візуальний огляд нуклеотидної послідовності. Таким чином, у способах, що заявляються, можна використовувати будь-які способи вибору сайту-мішені.

Сайти-мішені, як правило, складаються з множини суміжних субділянок-мішеней. Субділянка-мішень відноситься до послідовності (як правило, триплету нуклеотидів або квадруплету нуклеотидів, який може перекриватися одним нуклеотидом із суміжним квадруплетом), що зв'язується з індивідуальним цинковим пальцем. Див., наприклад, патент

США № 6,794,136. Якщо ланцюг, з яким білок з цинковими пальцями утворює найбільше контактів, позначити як ланцюг-мішень, "ланцюг первинного розпізнавання" або "ланцюг первинного контакту", то деякі білки з цинковими пальцями зв'язуються з триплетом з трьох основ у ланцюгу-мішені і з четвертою основою, яка не знаходиться у ланцюгу-мішені. Як правило, довжина сайту-мішені складає принаймні 9 нуклеотидів, і, таким чином, вона є зв'язаною зв'язувальним доменом цинкових пальців, що містить принаймні три цинкові пальці. Проте також є можливим зв'язування, наприклад, зв'язувального домену з 4 пальцями з ділянкою-мішенню, що містить 12 нуклеотидів, зв'язувального домену з 5 пальцями з ділянкою-мішенню, що містить 15 нуклеотидів, або зв'язувального домену з 6 пальцями з ділянкою-мішенню, що містить 18 нуклеотидів. Як буде зрозумілим, також є можливим зв'язування більш великих зв'язувальних доменів (наприклад, таких, що складаються з 7, 8, 9 і більше пальців) з довшими сайтами-мішенями.

Для ділянки-мішені не є обов'язково бути кратною трьом нуклеотидам. Наприклад, у випадках, коли має місце перехресна взаємодія з ланцюгами (див., наприклад, патент США № 6453242 та WO 02/077227), один або більше індивідуальних цинкових пальців зв'язувального домену з множиною пальців може зв'язуватися з квадруплетними субділянками, що перекриваються. В результаті цього білок з трьома пальцями може зв'язувати послідовність, яка містить 10 нуклеотидів, де десятий нуклеотид є частиною квадруплета, зв'язаного з кінцевим пальцем, білок з чотирма пальцями може зв'язувати послідовність, яка містить 13 нуклеотидів, де тринадцятий нуклеотид є частиною квадруплета, зв'язаного з кінцевим пальцем, і т. д.

У деяких варіантах реалізації сайт-мішень являє собою AHAS локус (включаючи нетрансльовані ділянки такі, як 3' нетрансльована ділянка AHAS). Необмежувальні приклади прийнятних сайтів-мішеней AHAS є представленими у Таблиці 3 та Таблиці 13. AHAS (що також є відомими як AHAS/ALS) гени є представленими в усіх основних видах рослин, включаючи, але без обмеження такими, як кукурудза, соя, бавовник, Arabidopsis, рис, соняшник, пшениця, ячмінь, цукровий буряк та Brassica. Були описані специфічні амінокислотні модифікації послідовності структурного гена AHAS, що змінюють одержану в результаті чутливість до різних структурних класів гербіцидів за відсутності негативного впливу на поведінку рослин. Наприклад, стійка до імідазолінону кукурудза (Zea mays L.) [Currie RS, Kwon CS та Penner D, Magnitude of imazethapyr resistance of corn (Zea mays) hybrids with altered acetolactate synthase. Weed Sci 43: 578–582 (1995), Wright TR та Penner D, Corn (Zea mays) acetolactate synthase sensitivity to four classes of ALS-inhibiting herbicides. Weed Sci 46: 8–12 (1998), Siehl DL, Bengtson AS, Brockman JP, Butler JH, Kraatz GW, Lamoreaux RJ та Subramanian MV, Patterns of cross tolerance to herbicides inhibiting acetohydroxyacid synthase in commercial corn hybrids designed for tolerance to imidazolinones. Crop Sci 36: 274–278 (1996), та Bailey WA та Wilcut JW, Tolerance of imidazolinone-resistant corn (Zea mays) to diclosulam. Weed Technol 17: 60–64 (2003)], рис (Oryza sativa L.) [Webster EP та Masson JA, Acetolactate synthase-inhibiting herbicides on imidazolinone-tolerant rice. Weed Sci 49:652–657 (2001) та, Gealy DR, Mitten DH та Rutger JN, Gene flow between red rice (Oryza sativa) and herbicide-resistant rice (O sativa): implications for weed management. Weed Technol 17:627–645 (2003)], м'яка пшениця (Triticum aestivum L.) [Newhouse K, Smith WA, Starrett MA, Schaefer TJ та Singh BK, Tolerance to imidazolinone herbicides in wheat. Plant Physiol 100: 882–886 (1992), та Pozniak CJ та Hucl PJ, Genetic analysis of imidazolinone resistance in mutatiom-derived lines of common wheat. Crop Sci 44:23–30 (2004)], та олійний рапс (Brassica napus та B. juncea L. Czern.) [Shaner DL, Bascomb NF та Smith W, Imiazolinone resistant crops: selection, characterization and management, у Herbicide resistant crops, під ред. Duke SO, CRC Press, Boca Raton, стор. 143–157 (1996) та Swanson EB, Herrgesell MJ, Arnoldo M, Sippell DW та Wong RSC, Microspore mutagenesis and selection: canola plants with field tolerance to the imidazolinones. Theor Appl Genet 78:525–530 (1989)], були одержані при використанні методик мутагенезу, селекції та традиційного розмноження та були комерціалізовані з 1992, 2003, 2002, та 1996, відповідно. Деякі AHAS гени, що кодують ферменти AHAS, які є толерантними до імідазолінонових гербіцидів, були виявлені у рослинах як існуючі у природі мутації, та при використанні процесу хімічно індукованого мутагенезу. S653N мутація відноситься до п'яти найбільш звичайних точкових мутацій у генах AHAS, що приводить до толерантності до імідазолінонових гербіцидів у рослин (Tan, S., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K., та Shaner, D.L. (2005) Imidazolinone-tolerant crops: History, current status and future. Pest Manag. Sci. 61: 246-257).

Крім того, на зв'язування з послідовністю-мішенню також впливає довжина та природа амінокислотних лінкерних послідовностей між окремими цинковими пальцями у зв'язувальному домені з декількома пальцями. Наприклад, присутність так званого "неканонічного лінкера",

"довгого лінкера" або "структурованого лінкера" між сусідніми цинковими пальцями в зв'язувальному домені з декількома пальцями може забезпечувати зв'язок цих пальців з субділянками, які не примикають одна до одної безпосередньо. Необмежувальні приклади таких лінкерів описуються, наприклад, у патенті США № 6479626 та WO 01/53480. Таким чином, одна або декілька субділянок у ділянці-мішені для зв'язувального домену цинкових пальців можуть бути відокремлені одна від одної 1, 2, 3, 4, 5 або більше нуклеотидами. Наприклад, зв'язувальний домен з чотирма пальцями може зв'язувати ділянку-мішень, що складається з 13 нуклеотидів, які містять послідовно дві суміжні субділянки з 3 нуклеотидів, проміжний нуклеотид та дві суміжні триплетні субділянки. Також див. публікації патентних заявок США № 20090305419 та 20110287512 для композицій та способів для зв'язування штучних нуклеаз для забезпечення зв'язування з сайтами-мішенями, розділеними різною кількістю нуклеотидів. Відстань між послідовностями (наприклад, сайтами-мішенями) відноситься до кількості нуклеотидів або пар нуклеотидів, що знаходяться між двома послідовностями, як вимірюється від кінців послідовностей, найближчих один до одного.

У деяких варіантах здійснення ДНК-зв'язувальні домени з функцією фактора транскрипції конструюють, наприклад, шляхом створення злитих білків, що включають ДНК-зв'язувальний домен, (наприклад, ZFP або TALE) домен регуляції транскрипції (наприклад, домен активації або репресії). Для функції як фактора транскрипції все, що в основному є необхідним, це просте зв'язування та достатня близькість до промотора. Точне позиціонування відносно промотора, орієнтація та розташування у певних межах, відстань не є дуже важливими. Ця властивість забезпечує істотну гнучкість у виборі сайтів-мішеней для конструювання штучних транскрипційних факторів. Сайт-мішень, що розпізнається ДНК-зв'язувальним доменом, може являти собою будь-який прийнятний сайт у гені-мішені, який забезпечує активацію або репресію експресії гена, необов'язково зв'язаного з регуляторним доменом. Переважні сайти-мішені включають ділянки, які знаходяться поряд, нижче або вище від ділянки старту транскрипції. Крім того, сайти-мішені можуть являти собою ділянки, розташовані в енхансерних ділянках, репресорних сайтах, ділянках зупинки РНК-полімерази та специфічних регуляторних ділянках (наприклад, ділянки SP-1, елементи відповіді на гіпоксію, елементи розпізнавання ядерного рецептора, сайти зв'язування p53), у ділянках кодуючої послідовності кДНК або у кодуючій ділянці маркерної експресованої послідовності (EST).

В інших варіантах здійснення конструюють ZFP з нуклеазною активністю. Експресія злитого білка, який містить ZFN, що включає зв'язувальний домен цинкових пальців та домен розщеплення (або два злитих білка, де кожний містить зв'язувальний домен цинкових пальців та напівдомен розщеплення) у клітині викликає розщеплення поряд з послідовністю-мішені. У деяких варіантах здійснення розщеплення залежить від зв'язування двох злитих молекул з доменами цинкових пальців/напівдоменами розщеплення з розділеними сайтами-мішенями. Два сайти-мішені можуть знаходитися на протилежних ланцюгах ДНК, або, альтернативно, обидва сайти-мішені можуть знаходитися на одному ланцюзі ДНК.

Для визначення того, чи модулює ZFP експресію генів, можна використовувати різноманітні аналізи. Активність конкретного ZFP можна оцінювати при використанні різних аналізів in vitro та in vivo, шляхом вимірювання, наприклад, рівнів білка або мРНК, рівнів продуктів, активності ферменту; активації або репресії транскрипції репортерного гена, наприклад, при використанні імунологічних аналізів (наприклад, ELISA та імуногістохімічних аналізів з антитілами), гібридизаційних аналізів (наприклад, захист від РНКази, Нозерн-блоттінг, гібридизація in situ, дослідження олігонуклеотидних наборів), колориметричних аналізів, аналізів ампліфікації, аналізів активності ферментів, аналізів фенотипу і т. п.

Як правило, ZFP спочатку тестують на активність in vitro при використанні аналізів ELISA, а потім при використанні дріжджової екпресійної системи. Часто ZFP спочатку піддають аналізу при використанні системи транзиторної експресії з репортерним геном, а потім аналізують регуляцію ендогенного гена-мішені в клітинах та у цільних рослинах, in vivo та ex vivo. ZFP можна рекомбінантно експресувати в клітині, рекомбінантно експресувати в клітинах, трансплантованих у рослину, або рекомбінантно експресувати в трансгенній рослині, а також вводити у рослину або клітину у вигляді білка при використанні векторів для доставки, описаних нижче. Клітини можуть бути імобілізованими, знаходитися в розчині, їх можна вводити в рослину шляхом ін'єкції, або вони можуть знаходитися у природі в трансгенній або нетрансгенній рослині.

Трансгенні та нетрансгенні рослини також можуть використовуватися як переважний варіант реалізації винаходу для дослідження регуляції ендогенної експресії гена in vivo. Трансгенні рослини можуть стабільно експресувати вибраний ZFP. Альтернативно, можна використовувати рослини, які транзієнтно експресують вибраний ZFP, або ті, в які вводять ZFP у векторі для

доставки. Регуляцію ендогенної експресії гена піддають аналізу при використанні будь-якого з аналізів, що описуються в даній заявці.

Способи для направленого розщеплення

Розкриті у даній заявці способи та композиції можуть використовуватися для розщеплення ДНК у ділянці, яка представляє інтерес, у клітинному хроматині (наприклад, у бажаному або попередньо визначеному сайті геному, наприклад, у гені AHAS або поряд з ним). Для такого направленого розщеплення ДНК-зв'язувальний домен цинкових пальців конструюють для зв'язування із сайтом-мішенню у попередньо визначеній ділянці розщеплення або поблизу неї, та злитий білок, що містить сконструйований зв'язувальний домен цинкових пальців та домен розщеплення, експресують у клітині. При зв'язуванні ДНК-зв'язувальної частини злитого білка з із сайтом-мішенню, ДНК піддається розщепленню поруч із сайтом-мішенню за допомогою домена розщеплення.

Альтернативно, у клітині експресують два злиті білки, де кожний містить ДНК-зв'язувальний домен та напівдомен розщеплення, та зв'язують із сайтами-мішенями, які розташовані поруч, таким чином, що функціональний домен розщеплення відновлюється та розщеплює ДНК поруч із сайтами-мішенями. В одному з варіантів здійснення розщеплення відбувається між сайтами-мішенями двох ДНК-зв'язувальних доменів. Один або обидва ДНК-зв'язувальні домени бути сконструйовані.

Для направленого розщеплення при використанні злитого поліпептиду зв'язувальний домен цинкових пальців-домен розщеплення сайт зв'язування може охоплювати ділянку розщеплення, або ближній кінець ділянки зв'язування може розташовуватися на відстані 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 25, 50 або більше нуклеотидів (або на відстані, що виражається будь-яким цілим значенням від 1 до 50 нуклеотидів) від сайту розщеплення. Точне положення ділянки зв'язування відносно ділянки розщеплення залежить від конкретного домену розщеплення і довжини ZC-лінкера. Для способів, в яких використовують два злитих поліпептиди, де кожний містить зв'язувальний домен цинкових пальців та напівдомен розщеплення, сайти зв'язування, як правило, розташовані з двох сторін від ділянки розщеплення. Таким чином найближчий кінець першої ділянки зв'язування може розташовуватися на відстані 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 25 або більше нуклеотидів (або на відстані, що виражається будь-яким цілим значенням від 1 до 50 нуклеотидів) з однієї сторони ділянки розщеплення, а найближчий кінець другої ділянки зв'язування може розташовуватися на відстані 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 25 або більше нуклеотидів (або на відстані, що виражається будь-яким цілим значенням від 1 до 50 нуклеотидів) з іншої сторони від ділянки розщеплення. Способи картування ділянок розщеплення in vitro та in vivo є відомими спеціалістам в даній галузі техніки.

Таким чином, способи, що описуються в даній заявці, можуть використовувати сконструйований зв'язувальний домен цинкових пальців, злитий з доменом розщеплення. У цих випадках зв'язувальний домен конструюють для зв'язування з послідовністю-мішенню в місці, де є бажаним розщеплення, або поруч з ним. Злитий білок або полінуклеотид, що кодує його, вводять у рослинну клітину. Після введення в клітину або експресії в ній злитий білок зв'язується з послідовністю-мішенню та здійснює розщеплення в послідовності-мішені або поруч з нею. Точна ділянка розщеплення залежить від характеру домену розщеплення та/або присутності, та/або природи лінкерних послідовностей між доменом зв'язування та доменом розщеплення. У випадках, коли використовують два злиті білки, де кожний містить напівдомен розщеплення, відстань між найближчими межами ділянок зв'язування може становити 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 25 або більше нуклеотидів (або відстань, що виражається будь-яким цілим значенням від 1 до 50 нуклеотидів). Оптимальні рівні розщеплення також можуть залежати від відстані між ділянками зв'язування двох злитих білків (див., наприклад, Smith та ін. (2000) Nucleic Acids Res. 28: 3361-3369; Bibikova та ін. (2001) Mol. Cell. Biol. 21:289-297) та довжини ZC-лінкера у кожному злитому білку. Див. також публікацію патентної заявки США № 20050064474A1 та публікації міжнародних заявок WO05/084190, WO05/014791 та WO03/080809.

У деяких варіантах реалізації домен розщеплення включає два напівдомени розщеплення, які обидва є частиною одного поліпептиду, що містить зв'язувальний домен, перший напівдомен розщеплення та другий напівдомен розщеплення. Напівдомени розщеплення можуть мати однакову амінокислотну послідовність або різні амінокислотні послідовності за умови, що вони функціонують для розщепленням ДНК.

Зв'язувальні домени зв'язуються з послідовностями-мішенями, які, як правило, розташовані таким чином, що після зв'язування злитих поліпептидів, два напівдомени розщеплення є представленими один відносно одного у такій просторовій орієнтації, що забезпечує відновлення домену розщеплення (наприклад, за допомогою димеризації напівдоменів), таким чином, розташовуючи напівдомени один відносно одного з утворенням функціонального домену

розщеплення, що приводить до розщеплення клітинного хроматину у ділянці, яка представляє інтерес. Як правило, розщеплення відновленим доменом розщеплення відбувається у ділянці, що розташована між двома послідовностями-мішенями. Один або обидва білки можуть бути сконструйовані для зв'язування зі своїм сайтом-мішенню.

Два злитих білка можуть зв'язуватися у ділянці, яка представляє інтерес, в одній і тій самій або протилежній полярності, та їх сайти зв'язування (тобто, сайти-мішені) можуть розділятися будь-якою кількістю нуклеотидів, наприклад, від 0 до 200 нуклеотидів або будь-якою кількістю нуклеотидів, що виражається цілим числом, між ними. У певних варіантах здійснення сайти зв'язування для двох злитих білків, кожний з яких містить зв'язувальний домен цинкових пальців і напівдомен розщеплення, можуть розташовуватися на відстані від 5 до 18 нуклеотидів, наприклад, на відстані 5-8 нуклеотидів, або на відстані 15-18 нуклеотидів або на відстані 6 нуклеотидів або на відстані 16 нуклеотидів, як вимірюється від кінця кожної ділянки зв'язування, найближчої до іншої ділянки зв'язування, а розщеплення відбувається між сайтами зв'язування.

Ділянка, в якій розщеплюється ДНК, як правило, розташована між сайтами зв'язування для двох злитих білків. Дволанцюговий розрив ДНК часто є результатом двох одноланцюгових розривів або "ніків" зі зміщенням на 1, 2, 3, 4, 5, 6 або більше нуклеотидів (наприклад, розщеплення дволанцюгової ДНК нативною FokI є результатом одноланцюгових розривів зі зміщенням на 4 нуклеотиди). Таким чином, розщеплення не обов'язково відбувається точно на протилежних сторонах кожного ланцюга ДНК. Крім того, структура злитих білків та відстань між сайтами-мішенями може впливати на те, чи відбувається розщеплення поруч з однією парою нуклеотидів, або розщеплення відбувається в декількох сайтах. Проте для багатьох застосувань, включаючи направлену рекомбінацію та направлений мутагенез (див. нижче), як правило, достатньо розщеплення в деякому діапазоні нуклеотидів, а розщеплення між конкретними парами основ не вимагається.

Як було вказано вище, злитий білок (білки) можна вводити як поліпептиди та/або як полінуклеотиди. Наприклад, у клітину можна вводити два полінуклеотиди, де кожний містить послідовності, що кодують один із вказаних вище поліпептидів, і коли поліпептиди експресуються та кожний зв'язується зі своєю послідовністю-мішенню, відбувається розщеплення у послідовності-мішені або поруч з нею. Альтернативно, в клітину можна вводити один полінуклеотид, що містить послідовності, які кодують обидва злиті поліпептиди. Полінуклеотиди можуть являти собою ДНК, РНК або будь-які модифіковані форми або аналоги ДНК та/або РНК.

Для підвищення специфічності розщеплення в способах, що описуються в даній заявці, можна використовувати додаткові композиції. Наприклад, одиночні напівдомени розщеплення можуть виявляти обмежену активність розщеплення двох ланцюгів. У способах, при яких у клітину вводять два злитих білка, де кожний містить домен цинкових пальців з трьома пальцями та напівдомен розщеплення, при цьому кожний білок визначає сайт-мішень, що включає приблизно 9 нуклеотидів. Незважаючи на те, що сукупна послідовність-мішень з 18 нуклеотидів, ймовірно, є унікальною в геномах ссавців і рослин, будь-яка дана ділянка-мішень з 9 нуклеотидів в середньому в геномі людини зустрічається приблизно 23000 разів. Таким чином, може відбуватися неспецифічне розщеплення, внаслідок специфічного для сайту зв'язування з одиничним напівдоменом. Таким чином, способи, що описуються в даній заявці, передбачають використання домінантно-негативного мутанта нуклеази (або нуклеїнової кислоти, що її кодує), що експресується в клітині разом з двома злитими білками. Домінантно-негативний мутант є здатним до димеризації, але не є здатним до розщеплення, а також блокує розщеплювальну активність напівдомену, з яким він димеризується. Шляхом забезпечення молярного надлишку домінантно-негативного мутанта по відношенню до злитих білків, тільки ділянки, в яких обидва злиті білки є зв'язаними, будуть мати достатньо високу локальну концентрацію функціональних напівдоменів розщеплення для здійснення димеризації та розщеплення.

В інших варіантах здійснення винаходу домен(и) нуклеази являє(ють) собою нікази, оскільки вони індукують розриви одного ланцюга. У деяких варіантах реалізації ніказа включає два домени нуклеази, один з яких є модифікованим (наприклад, є каталітично неактивним) так, що нуклеаза здійснює розрив тільки одного ланцюга. Такі нікази описуються, наприклад, у публікації патентної заявки США № 20100047805. Дві нікази можуть використовуватися для індукції розриву подвійного ланцюга.

Вектори експресії

Нуклеїнову кислоту, що кодує один або кілька білків (наприклад, ZFN, TALEN, тощо), як описано в даній заявці, можна клонувати у вектор для трансформації у прокаріотичні або еукаріотичні клітини для реплікації та/або експресії. Вектори можуть являти собою прокаріотичні вектори, наприклад, плазміди або човникові (біфункціональні) вектори, вектори комах, вірусні

вектори або еукаріотичні вектори. Нуклеїнову кислоту, що кодує злитий білок, також можна клонувати у вектор експресії для введення у клітину.

Для експресії злитих білків послідовності, що кодують злиті білки, як правило, субклонують у вектор експресії, що містить промотор, який контролює транскрипцію. Прийнятні прокаріотичні та еукаріотичні промотори є добре відомими в даній галузі техніки та описані, наприклад, у Sambrook та ін., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2-е вид. 1989; 3-є вид., 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); та Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel та ін., вище). Бактеріальні експресійні системи для експресії ZFP є доступними, наприклад, в E. coli, Bacillus sp., та Salmonella (Palva та ін., Gene 22:229-235 (1983)). Набори для таких систем експресії є комерційно доступними. Еукаріотичні системи експресії для клітин ссавців, рослин, дріжджів та комах є добре відомими фахівцям в даній галузі техніки та також є комерційно доступними.

Промотор, що використовується для безпосередньої експресії нуклеїнової кислоти, що кодує злитий білок, залежить від конкретного застосування. Наприклад, сильний конститутивний промотор, прийнятний для клітини-хазяїна, типово використовується для експресії та очистки злитих білків.

На відміну від цього, коли злитий білок вводиться in vivo для регуляції генів рослини (див., розділ "Доставка нуклеїнових кислот у рослинні клітини", що представлений нижче), використовують або конститутивний, або регульований (наприклад, стадіями розвитку, типом тканини або клітини, або зовнішнім середовищем) індуцибельний промотор залежно від конкретного застосування. Необмежувальні приклади промоторів рослин включають промоторні послідовності, що мають походження від убіквітину-3 A. thaliana (ubi-3) (Callis, та ін., 1990, J. Biol. Chem. 265-12486-12493); манно пін синтази A. tumefaciens (Δmas) (Petolino та ін., патент США № 6,730,824); та/або вірусу мозаїки жилок маніока (CsVMV) (Verdaguer та ін., 1996, Plant Molecular Biology 31:1129-1139). Див. також розділ "Приклади".

Крім промотора, вектор експрсії, як правило, містить транскрипційну одиницю або касету експресії, яка включає всі додаткові елементи, необхідні для експресії нуклеїнової кислоти в клітинах-хазяїна, або прокаріотичних або еукаріотичних. Таким чином, типова експресійна касета містить промотор (що включає сайти зв'язування рибосоми), оперативно зв'язаний, наприклад, з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує злитий білок, і сигнали, які є необхідними, наприклад, для ефективного поліаденілування транскрипту, термінації транскрипції, або термінації трансляції. Додаткові елементи касети можуть включати, наприклад, енхансери, гетерологічні сигнали сплайсингу, 2A послідовність з вірусу Thosea asigna (Mattion та ін. (1996) J. Virol. 70:8124-8127) та/або сигнал ядерної локалізації (NLS).

Конкретний експресійний вектор, що використовується для транспорту генетичної інформації у клітину, вибирають, беручи до уваги застосування злитих білків, яке передбачається, наприклад, експресію у рослинах, тваринах, бактеріях, грибах, найпростіших і т. д. (див. експресійні вектори, описані нижче). Стандартні бактеріальні та тваринні експресійні вектори є відомими та детально описаними у даній галузі техніки, наприклад, у патентній публікації США № 20050064474A1 та у міжнародних патентних публікаціях WO05/084190, WO05/014791 та WO03/080809.

Стандартні способи трансфекції можуть використовуватися для одержання ліній клітин бактерій, ссавців, рослин, дріжджів або комах, які експресують великі кількості білка, які потім можна очищати при використанні стандартних способів, (див., наприклад, Colley та ін., J. Biol. Chem. 264: 17619-17622 (1989); Guide to Ptrotein Purification, in Methods in Enzymology, том 182 (Deutscher, ред., 1990)). Трансформацію еукаріотичних та прокаріотичних клітин здійснюють у відповідності зі стандартними способами (див., наприклад, Morrison, J. Bact. 132:349-351 (1977); Clark-Curtiss та Curtiss, Methods in Enzymology 101:347-362 (Wu та ін., ред., 1983).

Можна використовувати будь-який з добре відомих способів введення чужорідних нуклеотидних послідовностей у такі клітини хазяїна. Вони включають використання трансфекції на основі фосфату кальцію, полібрену, злиття протопластів, електропорації, ультразвукових способів (наприклад, сонопорації), ліпосом, мікроін'єкцій, "оголених" ДНК, плазмідних векторів, вірусних векторів, опосередкованої Agrobacterium трансформації, опосередкованої карбідом кремнію (наприклад, WHISKERS™) трансформації, епісомального та інтегративного способу та будь-якого з інших добре відомих способів введення клонованої геномної ДНК, кДНК, синтетичної ДНК або іншого чужорідного генетичного матеріалу в клітину-хазяїна (див., наприклад, Sambrook та ін., вище). Необхідно тільки, щоб конкретна використовувана процедура генетичної інженерії дозволяла успішно вводити принаймні один ген у клітину-хазяїна, здатну до експресії вибраного білка.

Донори

Як зазначалося вище, може також передбачатися інсерція однієї або більше екзогенних послідовностей (так званої "донорної послідовності" або "донора", або "трансгена"), наприклад, для стекінгу. Донорна послідовність може містити негомологічну послідовність, фланковану двома гомологічними ділянками для того, щоб дозволити проведення ефективної HDR у положенні, що представляє інтерес. Крім того, донорні послідовності можуть включати молекулу вектора, що містить послідовності, які не є гомологічними до ділянки, що представляє інтерес, у хроматині клітини. Донорна молекула може містити кілька дискретних ділянок гомології до хроматину клітини. Наприклад, для націленої інсерції послідовностей, що у нормі не є присутніми у ділянці, яка представляє інтерес, вказані послідовності можуть бути присутніми у донорній молекулі нуклеїнової кислоти та фланковані ділянками гомології до послідовності у ділянці, що представляє інтерес.

Донорний полінуклеотид може являти собою ДНК або РНК, одноланцюгову або дволанцюгову молекулу, та може бути введений у клітину у лінійній або кільцевій формі. Див., наприклад, публікації патентних заявок США №№ 20100047805; 20110281361; та 20110207221. Якщо молекула вводиться у лінійній формі, то кінці донорної послідовності можуть бути захищеними (наприклад, від деградації екзонуклеазами) за допомогою способів, відомих у даній галузі техніки. Наприклад, один або більше дидезоксинуклеотидних залишків додають до 3' кінця лінійної молекули та/або самокомплементарні олігонуклеотиди лігують до одного або обох кінців. Див., наприклад, Chang та ін. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls та ін. (1996) Science 272: 886-889. Додаткові способи захисту екзогенних полінуклеотидів від деградації включають, але не обмежуються такими, як додання термінальної(их) аміногрупи(груп) та використання модифікованих інтернуклеотидних зв'язків, таких як, наприклад, фосфоротіоати, фосфорамідати та О-метилрибоза або залишки дезоксирибози.

Полінуклеотид може бути введений у клітину як частина молекули вектора, що має додаткові послідовності, такі, як, наприклад, точка початку реплікації, промотори та гени, що кодують стійкість до антибіотиків. Крім того, донорні полінуклеотиди можуть бути введені як оголена нуклеїнова кислота, як нуклеїнова кислота у комплексі з агентом, таким як ліпосома або полоксамер, або можуть бути доставлені при використанні вірусів (наприклад, аденовірусу, AAV, вірус герпесу, ретровірусу, лентивірусу та лентивірусів, дефектних за інтегразою (IDLV)). Див., наприклад, публікацію патентної заявки США № 20090117617.

Як правило донор вбудовують так, щоб експресія направлялася ендогенним промотором у сайті інтеграції, зокрема, промотором, що направляє експресію ендогенного гена, в який вбудований донор. Проте буде очевидним, що донор може включати промотор та/або енхансер, наприклад, конститутивний промотор або індуцибельний, специфічний для тканини промотор. Крім того, донорна молекула може бути вбудована в ендогенний ген так, що експресуються усі, деякі ендогенні гени або жоден ендогенний ген не експресується.

Крім того, незважаючи на те, що це не вимагається для експресії, екзогенні послідовності можуть також включати регуляторні послідовності транскрипції або трансляції, наприклад, промотори, енхансери, інсулятори, ділянку внутрішньої посадки рибосоми, послідовності, які кодують 2A пептиди та/або сигнали поліаденілування.

Донорна послідовність вводиться в ендогенний ген (або множинні алелі гена) так, що функція ендогенного гена змінюється для того, щоб функціонувати як ендогенний маркер для інтеграції трансгена, що, таким чином, приводить до геномної модифікації. У деяких варіантах реалізації ендогенний локус у який трансген(и) вводиться(вводяться) являє собою локус AHAS. Деякі мутації у гені AHAS є відомими як такі, що надають толерантності до гербіцидів групи B або гербіцидів на основі інгібіторів ALS (наприклад, імідазолінон або сульфонілсечовина), включаючи точкову мутацію серину у положенні 653 на аспарагін (S653N). Див., наприклад, Lee та ін. (2011) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 108: 8909–8913, та Tan, S., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K., та Shaner, D.L. (2005) Imiazolinone-tolerant crops: History, current status and future. Pest Manag. Sci. 61:246-257.

AHAS являє собою один з бажаних локусів, оскільки ген є транскрипційно активним на усіх стадіях розвитку рослини, він не є схильним до сайленсінгу гена (наприклад, при використанні ДНК, метилювання гістонів, іРНК, і т. д.), де інсерція нового гену або одиниці трансформації рослини у локус не справляє негативного впливу на агрономічні властивості або показники якості рослини-хазяїна. Убіквітарний характер локусу AHAS та чітке комерційне підтвердження того, що зміна AHAS локусу або локусів у ріпаку, кукурудзі, соняшнику, бавовнику, сої, цукрових буряках, пшениці та у будь-якій іншій рослині не спричинює агрономічних погіршень або негативних впливів на якість, означає, що локуси AHAS являють собою широкий клас бажаних локусів-мішеней в усіх комерційно релевантних видах рослин.

Інтеграція донорної ДНК у локус AHAS дикого типу (чутливий до гербіцидів) типово вбудовує

як екзогенну послідовність (наприклад, трансген), так і мутацію в ендогенний AHAS з одержанням геномної модифікації, яка забезпечує стійкість до імідазолінонів (тобто, продукту, що приводить до одержання стійкої до гербіцидів клітини), дозволяючи, таким чином, здійснити регенерацію правильно націлених рослин при використанні ендогенної системи селекції на імідазолінон більш бажано, ніж при використанні системи трансгенного селективного маркера. Стекінг другого трансгена у локус AHAS може бути досягнутий шляхом інтеграція донорної ДНК, що вводить один або більше додаткових трансгенів, забезпечує чутливість до імідазолінонів, але толерантність до сульфонілсечовин (тобто продукту, що приводить до одержання толерантної до гербіцидів рослинної клітини), дозволяючи, таким чином, проводити регенерацію правильно націлених рослин при використанні агенту для селекції на сульфонілсечовину. Стекінг третього трансгена може бути досягнутий шляхом інтеграції донорної ДНК що вбудовує додатковий(і) трансген(и) та надає чутливості до сульфонілсечовини та толерантності до імідазолінонів, дозволяючи, таким чином, проводити регенерацію правильно націлених рослин при використанні агенту для селекції на імідазолінон. Як такі, повторювані цикли послідовного стекінгу трансгенів є можливими шляхом застосування донорних молекул, що вводять мутації (наприклад, геномну модифікацію) в AHAS дикого типу, дозволяючи, таким чином, проводити диференційні циклічні повтори між агентами селекції на сульфонілсечовину та імідазолінон.

Доставка нуклеїнової кислоти у рослинні клітини

Як було зазначено вище, конструкції (наприклад, нуклеази(нуклеаз) та/або донора(ів)) можуть бути введені (наприклад, у геном) у бажану рослину-хазяїна при використанні різноманітних загальноприйнятих методик. Для огляду таких методик див., наприклад, Weissbach та Weissbach Methods for Plant Molecular Biology (1988, Academic Press, N.Y.) Розділ VIII, стор. 421-463; та Grierson та Corey, Plant Molecular Biology (1988, 2d Ed.), Blackie, London, глава 7-9. Див. також публікації патентних заявок США №№ 20090205083; 20100199389; 20110167521 та 20110189775, що є введеними у дану заявку як посилання у своїй цілісності. При цьому буде зрозумілим, що одна або більше конструкцій ДНК можуть використовуватися у практиці даного винаходу, наприклад, нуклеаза(и) можуть переноситися тією самою конструкцією або різними конструкціями у вигляді конструкції(ій), які несуть донор(и).

Конструкцію(ї) ДНК може(уть) бути введена(і) безпосередньо в геномну ДНК рослинної клітини при використанні таких методик, як електропорація та мікроін'єкція, у протопласти рослинної клітини, або конструкції ДНК можуть бути введені безпосередньо в тканину рослини при використанні біолістичних способів, таких як бомбардування частинками ДНК (див., наприклад, Klein та ін., (1987) Nature 327:70-73). Альтернативно конструкція ДНК може бути введена у рослинну клітину за допомогою трансформації наночастинками (див., наприклад, публікацію патентної заявки США № 20090104700, яка є введеною у дану заявку як посилання у своїй цілісності). Альтернативно конструкції ДНК можна поєднувати з прийнятними граничними/фланкуючими ділянками Т-ДНК та вводити у традиційний вектор-хазяїн на основі Agrobacterium tumefaciens. Опосередковані Agrobacterium tumefaciens методики трансформації, включаючи нейтралізацію онкогенів та розробку і застосування бінарних векторів, є добре описаними в науковій літературі. Див., наприклад, Horsch та ін. (1984) Science 233:496-498, та Fraley та ін. (1983) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 80:4803.

Крім того, перенесення генів може бути досягнуто при використанні бактерій, відмінних від Agrobacterium, або вірусів, таких, як види Rhizobium sp. NGR234, Sinorhizoboium meliloti, Mesorhizobium loti, X вірус картоплі, вірус мозаїки цвітної капусти та вірус мозаїки жилок маніока та/або вірус тютюнової мозаїки, див., наприклад, Chung та ін. (2006) Trends Plant Sci. 11(1):1-4.

Вірулентні функції хазяїна Agrobacterium tumefaciens будуть направляти інсерцію Т-ланцюга, що містить конструкцію та сусідній маркер, у ДНК рослинної клітини, коли клітину інфікують бактеріями при використанні бінарного вектора Т-ДНК (Bevan (1984) Nuc. Acid Res. 12: 8711-8721) або процедури сумісного культивування (Horsch та ін. (1985) Science 227: 1229-1231). Як правило, систему трансформації на основі Agrobacterium використовують для конструювання дводольних рослин (Bevan та ін., (1982) Ann. Rev. Genet 16:357-384; Rogers та ін., (1986) Methods Enzymol. 118:627-641). Систему трансформації на основі Agrobacterium також можна використовувати для трансформації, а також для перенесення ДНК в однодольні рослини і рослинні клітини. Див. патент США № 5591616; Hernalsteen та ін., (1984) EMBO J. 3:3039-3041; Hooykass-Van Slogteren та ін., (1984) Nature 55 311:763-764; Grimsley et al. (1987) Nature 325:1677-179; Boulton та ін., (1989) Plant Mol. Biol. 12:31-40; та Gould та ін., (1991) Plant Physiol. 95:426-434.

Альтернативні способи перенесення генів та трансформації включають, але без обмеження такими, як трансформація протопластів, опосередкована кальцієм, поліетиленгліколем (ПЕГ), або опосередковане електропорацією захоплення "оголеної" ДНК (див. Paszkowski та ін. (1984)

EMBO J. 3: 2717-2722, Potrykus та ін. (1985) Molec. Gen. Genet. 199:169-177; Fromm та ін. (1985) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82: 5824-5828; та Shimamoto (1989) Nature 338: 274-276) та електропорація рослинних тканин (D'Halluin та ін. (1992) Plant Cell 4:1495-1505). Додаткові способи для трансформації рослинних клітин включають мікроін'єкцію, опосередковане карбідом кремнію (наприклад, WHISKERS™) захоплення ДНК (Kaeppler та ін. (1990) Plant Cell Reporter 9: 415-418) та балістичну трансфекцію (див. Klein та ін. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:4305-4309; та Gordon-Kamm та ін. (1990) Plant Cell 2:603-618). На завершення, наночастинки, наноносії та проникаючі у клітину пептиди можуть використовуватися для доставки ДНК, РНК, пептидів та/або білків у рослинні клітини (див. WO/2011/26644, WO/2009/ та WO/2008/148223).

Розкриті способи та композиції можуть використовуватися для інсерції екзогенних послідовностей в AHAS ген. Це є корисним, в зв'язку з тим, що експресія введеного у рослинний геном трансгена критично залежить від його сайту інтеграції та, як було зазначено раніше, AHAS забезпечує прийнятний сайт для інтеграції трансгена. Таким чином, гени, що кодують, наприклад, толерантність до гербіцидів, стійкість для комах, поживні речовини, антибіотики або терапевтичні молекули, можуть бути вбудовані шляхом направленої рекомбінації у ділянки рослинного генома, сприятливі для їх експресії.

Трансформовані рослинні клітини, що одержують у відповідності з будь-яким з вказаних вище способів трансформації, можна культивувати для регенерації цільної рослини, яка має трансформований генотип і, таким чином, бажаний фенотип. Такі способи регенерації базуються на впливі певними фітогормонами у середовищі для вирощування культури тканин, як правило, здійснюються при використанні біоцидного та/або гербіцидного маркера, що вводиться разом з бажаними нуклеотидними послідовностями. Регенерація рослин з культивованих протопластів є описаною у Evans, та ін., "Protoplasts Isolation and Culture" у Handbook of Plant Cell Culture, стор. 124-176, 20 Macmillian Publishing Company, New York, 1983; та Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, стор. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. Регенерацію також можна проводити при використанні калусів, експлантатів, органів, пилка, ембріонів рослин або частин рослин. Такі способи регенерації в основному описані у Klee та ін. (1987) Ann. Rev. of Plant Phys. 38:467-486.

Нуклеїнові кислоти, що вводяться в рослинну клітину, можна використовувати для забезпечення бажаних ознак суттєво у будь-якій рослині. При використанні конструкцій нуклеїнових кислот згідно з даною заявкою та різноманітних способів трансформації, згаданих вище, можна сконструювати широку різноманітність рослин і систем рослинних клітин з бажаними фізіологічними та агрономічними характеристиками, що описуються в даній заявці. У переважних варіантах здійснення цільові рослини та цільові рослинні клітини для конструювання включають, але не обмежуються такими, як однодольні та дводольні рослини такі, як сільськогосподарські культури, включаючи зернові культури (наприклад, пшеницю, кукурудзу, рис, просо, ячмінь), плодові культури (наприклад, помідор, яблуко, груша, полуниці, апельсин), кормові культури (наприклад, люцерна), коренеплоди (наприклад, морква, картопля, цукровий буряк, батат), листові овочеві культури (наприклад, салат-латук, шпинат); квітучі рослини (наприклад, петунія, троянда, хризантема), хвойні та соснові дерева (наприклад, сосна, ялиця, ялина); рослини, що використовуються в фітомедицині (наприклад, рослини, що акумулюють важкі метали); олійні культури (наприклад, соняшник, насіння ріпаку, соя) і рослини, що використовуються в експериментальних цілях (наприклад, Arabidopsis). Таким чином, розкриті способи та композиції знаходять застосування для широкого діапазону рослин, включаючи, але без обмеження такими, як види родів Asparagus, Avena, Brassica, Citrus, Citrullus, Capsicum, Cucurbita, Daucus, Erigeron, Glycine, Gossypium, Hordeum, Lactuca, Lolium, Lycopersicon, Malus, Manihot, Nicotiana, Orychophragmus, Oryza, Persea, Phaseolus, Pisum, Pyrus, Prunus, Raphanus, Secale, Solanum, Sorghum, Triticum, Vitis, Vigna та Zea.

Введення нуклеїнових кислот у рослинну клітину може бути використане для надання бажаних якостей суттєво будь-якій рослині. У деяких варіантах реалізації інтегрований(ы) трансген(и) у рослинних клітинах приводить(ять) до збільшення врожаю плодів, збільшення біомаси рослин (або плодів рослини), високої частки м'якоті фруктів, підвищення зав'язування плодів, більших розмірів рослин, збільшення сирої ваги, збільшення сухої ваги, збільшення вмісту твердих речовин, більшої загальної ваги при збиранні, підвищеної інтенсивності та/або однорідності кольору врожаю, змінених хімічних характеристики (наприклад, олыъ, жирних кислот, вуглеводыв, білкыв) і т. д.

Спеціалістові в даній галузі техніки буде зрозумілим, що екзогенна послідовність може бути транзієнтно введена у рослинну клітину. Введення екзогенної полінуклеотидної послідовності може використовувати механізми рослинної клітини, в яку була введена послідовність. Експресію екзогенної послідовності полінуклеотиду, що включає ZFN, який транзієнтно

вбудований у рослинну клітину, можна піддавати аналізу за допомогою аналізу послідовності-мішені геномної ДНК для ідентифікації та визначення будь-яких інсерційно-делеційних мутацій, інверсій або інсерцій. Ці типи перегрупувань утворюються в результаті розщеплення сайту-мішені в послідовності геномної ДНК і подальшого відновлення ДНК. Крім того, експресія екзогенної полінуклеотидної послідовності може бути проаналізована при використанні способів, які дозволяють проводити аналіз експресії маркерного гена, який є відомим середньому спеціалісту в даній галузі техніки. Транзієнтна експресія маркерних генів була продемонстрована при використанні різноманітних рослин, тканин та систем доставки ДНК.

Системи для проведення аналізу транзієнтної експресії, включають, але без обмеження такими, як безпосередня доставка генів шляхом електропорації або бомбардування частинками тканини у будь-якому аналізі транзієнтної експресії рослини при використанні будь-яких видів рослин, що представляють інтерес. Такі системи для транзієнтного аналізу експресії будуть включати, але не обмежуються такими, як електропорація протопластів з різноманітних джерел тканин або бомбардування частинками конкретних тканин, що представляють інтерес. Дана заявка охоплює застосування будь-якої системи транзієнтної експресії для оцінки сайт-специфічної ендонуклеази (наприклад, ZFN) та для введення трансгенів та/або мутацій у ген-мішень (наприклад, AHAS), що призводить до геномної модифікації. Приклади рослинних тканин, що передбачені для перевірки у часі при використанні прийнятної системи доставки будуть включати, але не обмежуються такими, як основні тканини листка, калусу, сім'ядолей, коріння, ендосперму, зародків, тканини квіток, пилку та епідермальна тканина.

Кваліфікованому спеціалісту у даній галузі техніки є зрозумілим, що екзогенна полінуклеотидна послідовність може бути стабільно введена у трансгенні рослини. Після того, як екзогенна полінуклеотидна послідовність підтверджується як така, що є функціональною, вона може бути введена в інші рослини шляхом статевого схрещування. Будь-який з ряду стандартних методів селекції може бути використаний у залежності від виду, який піддається схрещуванню.

Трансформовані клітини, калус, тканини рослини або рослину можна ідентифікувати та ізолювати за допомогою селекції або скринінгу сконструйованого рослинного матеріалу рослин за ознаками, що кодуються маркерними генами, які є присутніми в екзогенній послідовності ДНК. Маркери також можуть бути описані та згадується як селективні маркери або репортерні маркери. Маркери можуть використовуватися для ідентифікації та відбору трансформованих рослин ("трансформантів"). Як правило, маркер вводять у геном рослинної клітини як екзогенну послідовність. У деяких прикладах послідовність екзогенного маркера вводиться у геном рослини у сайт-специфічному цільовому локусі як донорна послідовність, де донорна послідовність містить мутації, які приводять до толерантності щодо селективного агента (наприклад, гербіцидів і т. д.). В інших прикладах послідовність екзогенного маркера вводиться у геном рослини як трансген (тобто "трансгенний селективний маркер"), де маркерний ген є оперативно зв'язаним з промотором та 3'-UTR для включення експресійної касети химерного гена. Експресія маркерного гена приводить до експресії візуального маркерного білка або до толерантності до селективного агента (наприклад, гербіциду, антибіотиків і т. п.).

Наприклад, селекція може бути проведена шляхом вирощування сконструйованого рослинного матеріалу на середовищах, що містять інгібувальну кількість антибіотика або гербіциду (тобто, що також описується як селективний агент), до якого трансформаційна генна конструкція забезпечує толерантність. В одному варіанті здійснення маркерні гени включають гени толерантності до гербіцидів.

Маркери толерантності до гербіцидів кодують модифікований цільовий білок, який є нечутливим до гербіциду, або фермент, який піддається деградації та нейтралізує гербіцид у рослині до того, як він почне діяти. Наприклад, модифікований цільовий білок, нечутливий до гербіциду, буде включати толерантність до гліфосату. Рослини толерантні до гліфосату, були отримані при використанні генів, що кодують мутантний цільовий фермент 5-енолпірувілшикімат-3-фосфат-синтазу (EPSPS). Гени та мутанти EPSPS є добре відомими та включають мутантні гени 5-енолпірувілшикімат-3-фосфат-синтази (EPSPS), dgt-28 та aroA. Такі гени забезпечують толерантність до гліфосату шляхом введення рекомбінантних нуклеїнових кислот та/або різноманітних форм in vivo мутагенезу нативних генів EPSP. Приклад ферментів, які руйнують та піддають детоксикації гербіцид у рослині, будуть включати стійкість до глюфозинату амонію, бромоксинілу та 2,4-дихлорфеноксіацетату (2,4-Д). Толерантність до цих гербіцидів було отримано шляхом експресії бактеріальних генів, які кодують гени pat або DSM-2, нітрілази, aad-1 або aad-12, у рослинній клітині як трансген. Гени толерантності до фосфонових сполук включають гени bar та pat з видів Streptomyces, у тому числі Streptomyces hygroscopicus і Streptomyces viridichromogenes, та піридинокси або феноксипропіонових кислот

та циклогексонів (гени, що кодують АССазу).

Приклади генів, що надають толерантності до циклогександіонів та/або арилоксифеноксипропаноєвої кислоти (у тому числі, галоксифопу диклофопу, феноксипропу, флуазифопу, хізалофопу), включають гени ацетил кофермент А карбоксилази (АССази), такої як, Acc1-S1, Acc1-S2 та Acc1-S3. В одному варіанті здійснення гербіциди можуть інгібувати фотосинтез, в тому числі триазини (гени psbA та 1s+) або бензонітрил (ген нітрілази). Інші послідовності генів стійкості до гербіцидів є відомими спеціалістам у даній галузі техніки.

Маркери стійкості до антибіотиків кодують фермент, який розкладає та піддає детоксикації антибіотик у рослині, перед тим як він починає діяти у рослині. Є відомими різноманітні типи антибіотиків, що можуть перешкоджати росту та розвитку рослин при використанні у відповідних концентраціях, зокрема, такі, як канаміцин, хлорамфенікол, спектиноміцин та гігроміцін. Екзогенні послідовності можуть бути одержані (наприклад, бактеріальні гени) та піддаватися експресії як трансген для розщеплення антибіотика. Наприклад, маркерні гени стійкості до антибіотиків, включають екзогенні послідовності, що кодують стійкість до антибіотиків такі, як гени, що кодують стійкість до неоміцин фосфотрансферази II (NEO), хлорамфеніколацетил трансферази (CAT), лужної фосфатази, сійкість до спектиноміцину, резистентність до канаміцину та гігроміцин фосфотрансферази (HPT).

Крім того, трансформовані рослини та рослинні клітини також можуть бути визначені шляхом скринінгу на активність репортерного гена, що кодує видимий продукт маркерного гена. Репортерні гени зазвичай забезпечуються як рекомбінантні конструкції нуклеїнових кислот та інтегруються у клітини рослин як трансген. Візуальне спостереження білків, що кодуються такими репортерними генами, наприклад, генами, що кодують β-глюкуронідазу (GUS), люциферазу, зелений флуоресцентний білок (GFP), жовтий флуоресцентний білок (YFP), DsRed, β-галактозидазу, може використовуватися для ідентифікації та селекції трансформантів. Такі методики селекції та скринінгу є добре відомими фахівцям у даній галузі техніки.

Приведений вище перелік маркерних генів не слід розуміти як обмежувальний. Будь-який репортерний або селективний маркерний ген охоплюється даним винаходом. Крім того, слід розуміти, що маркери (наприклад, маркери толерантності до гербіцидів) в основному використовується для ідентифікації та селекції трансформованих рослин, у порівнянні з ознакою (наприклад, ознаками толерантності до гербіцидів), які використовуються для забезпечення стійкості до гербіцидів, що застосовуються у польових умовах для контролю видів бур'янів.

Фізичні та біохімічні способи також можуть використовуватися для ідентифікації трансформантів рослин або рослинних клітин, що містять стабільно вбудовані генні конструкції, або рослинної клітини, що містить змінену геномну ДНК цільового гена, що приводить до тимчасової експресії сайт-специфічної ендонуклеази (наприклад, ZFN). Ці способи включають, але без обмеження такими, як: 1) Саузерн-аналіз або ПЛР ампліфікація для визначення структури інсерту рекомбінантної ДНК; 2) Нозерн-блоттінг, захист від РНКази S1, подовження праймера або ПЛР ампліфікація при використанні зворотної транскриптази для визначення та дослідження РНК-транскриптів генних конструкцій; 3) ферментативні аналізи для визначення ферментативної або рибозимної активності, де такі продукти генів кодуються генною конструкцією; 4) електрофорез білків у гелі, способи вестерн-блоттінгу, імунопреципітація або твердофазні імуноферментні аналізи (ELISA), де продуктами генної конструкції є білки. Додаткові методики такі, як гібридизація in situ, ферментне забарвлювання та імунозабарвлювання, також можна використовувати для визначення присутності або експресії рекомбінантної конструкції в конкретних органах та тканинах рослин. Способи проведення усіх цих аналізів є добре відомими фахівцям в даній галузі техніки.

Ефекти маніпуляцій з генами при використанні способів, які розкриті в даній заявці, можна спостерігати, наприклад, за допомогою Нозерн-блоттінгу РНК (наприклад, мРНК), виділеної з тканин, які представляють інтерес. Як правило, якщо є присутньою мРНК або кількість мРНК зростає, можна вважати, що відповідний ендогенний ген експресується в більшій мірі, ніж раніше. Можуть використовуватися інші способи вимірювання активності гена та/або активності кодованого поліпептиду. Можна використовувати різні типи ферментативних аналізів залежно від використовуваного субстрату та способу визначення підвищення або зниження кількості продукту реакції або побічного продукту. Крім того, рівні поліпептиду, що експресується, можуть вимірюватися імунохімічно, тобто за допомогою ELISA, RIA, EIA та інших аналізів, що базуються на антитілах, які є добре відомими фахівцям в даній галузі техніки, таких, як аналіз електрофоретичного визначення (із фарбуванням або з Вестерн-блоттінгом). Як один з необмежувальних прикладів можна привести визначення білків AAD-1 та PAT при використанні аналізу ELISA, як описується у публікації патентної заявки США № 20090093366, посилання на

яку є введеним у дану заявку у своїй цілісності. Трансген може бути селективно експресований у деяких тканинах рослини або на деяких стадіях розвитку, або трансген може бути експресований суттєво в усіх тканинах рослини, суттєво протягом усього життєвого циклу. Проте також є прийнятним будь-який комбінаторний спосіб експресії.

Дана заявка також охоплює насіння трансгенних рослин, що описані вище, де насіння має трансген або генну конструкцію. Дана заявка додатково охоплює потомство, клони, клітинні лінії або клітини трансгенних рослин, що описані вище, де вказані потомство, клон, клітинна лінія або клітина мають трансген або генну конструкцію.

Злиті білки (наприклад, ZFN) та експресійні вектори, що кодують злиті білки, можуть безпосередньо вводитися у рослину для регуляції генів, націленого розщеплення та/або рекомбінації. У деяких варіантах реалізації рослина містить множинні паралоги цільових генів. Наприклад, для AHAS, Brassica napus включає 5 паралогів, а пшениця включає 3 паралоги. Таким чином, один або більше різних злитих білків або експресійних векторів, що кодують злиті білки, можуть вводитися у рослину для націлювання одного або більше цих генів паралогів у рослині.

Введення ефективних кількостей будь-яким способом у нормі використовується для приведення злитих білків у тісний контакт з рослинною клітиною, що піддається обробці. ZFPs вводят будь-яким прийнятним способом, бажано при використанні прийнятних носіїв. Прийнятні способи введення таких модуляторів є доступними та добре відомими кваліфікованим спеціалістам у даній галузі техніки та, незважаючи на те, що може використовуватися більше одного способу для введення конкретної композиції, конкретний шлях може часто забезпечувати більш швидку та більш ефективну реакцію, ніж інший шлях.

Носії також можуть використовуватися та частково визначаються композицією, що вводиться, а також конкретним способом, що використовується для введення композиції. У відповідності із цим існує широка різноманітність прийнятних композицій носіїв, які є доступними.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1: Характеристика геномних цільових послідовностей AHAS

Ідентифікація послідовностей AHAS

дентифікували та визначали тринскрибовані ділянки для трьох гомологічних генів AHAS. Ці нові послідовності є приведеними як SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 та SEQ ID NO:3. Попередні спроби секвенування забезпечили ідентифікацію та картування гомологічних копій AHAS генів з Triticum aestivum до довгого плеча хромосом 6A, 6B та 6D (Anderson та ін., (2004) Weed Science 52: 83-90; та Li та ін., (2008) Molecular Breeding 22: 217-225). Аналіз послідовностей для маркерних послідовностей, що експресуються (EST), та геномних послідовностей, що є доступними у Genbank (номери депонування: AY210405.1, AY210407.1, AY210406.1, AY210408.1, FJ997628.1, FJ997629.1, FJ997631.1, FJ997630.1, FJ997627.1, AY273827.1), використовували для визначення транскрибованої ділянки для гомологічних копій гена AHAS (SEQ ID NO: 1-3).

Спочатку характеризували нові некодуючі послідовності, розміщені вище та нижче від транскрибованої ділянки. Для повної характеристики цих некодуючих послідовностей транскрибовані послідовності для кожної з трьох гомологічних копій гену AHAS використовували як BLASTN™ запити для скринінгу зчитування послідовності ROCHE 454™, що складається з окремих елементів, та яка була одержана в результаті повного шот-ган сиквенсу генома Triticum aestivum культивару Chinese Spring. Зчитування послідовності ROCHE 454™ Triticum aestivum культивару Chinese Spring було одержане до 5-кратного покриття послідовності. Зборку послідовність завершували при використанні SEQUENCHER SOFTWARE™ (GeneCodes, Ann Arbor, MI) для ROCHE 454™. Зчитування послідовності із значущим BLASTN хітом (e-значення < 0,0001) використовували для характеристики цієї нетранскрибованої ділянки. Проводили повторювані цикли BLASTN™ аналізу та зборку послідовності Кожний повтор вводили у зібрану послідовність AHAS, одержану на етапі попередньої зборки, так що всі послідовності були складені у вигляді однієї безперервної послідовності. У цілому, були охарактеризовані 4384, 7590 та 6205 геномні послідовності для гомологічних генів AHAS, розташованих у хромосомах 6a, 6b та 6D, відповідно (SEQ ID NO:4-6).

Аналіз послідовності генів AHAS, ізольованих з Triticum aestivum культивару Bobwhite MPB26RH

Гомологічні копії гена AHAS клонували та секвенували з Triticum aestivum культивару Bobwhite MPB26RH для одержання нуклеотидної послідовності, прийнятної для конструювання специфічних білків "цинкових пальців", що можуть зв'язувати послідовності з високим ступенем специфічності. Сиквенс-аналіз нуклеотидних послідовностей AHAS, одержаних з Triticum

aestivum культивару Bobwhite MPB26RH, був необхідним для підтвердження анотації нуклеотидів, представлених у Genbank, та послідовностей ROCHE 454™ гена AHAS та завдяки алельним варіаціям, що існували між культиваром Bobwhite MPB26RH та іншими сортами пшениці, з яких були одержані послідовності Genbank та ROCHE 454™.

Конструювали групу праймерів ПЛР (Таблиця 1) для ампліфікації AHAS генів. Праймери конструювали з консенсусної послідовності, яка була одержана в результаті множинних вирівнювань послідовності, одержаної при використанні CLUSTALW™ (Thompson та ін., (1994) Nucleic Acids Research 22: 4673-80). Вирівнювання послідовностей поєднували з даними секвенування культивару Chinese Spring, одержаними при секвенуванні ROCHE 454™, яке завершували при 5-кратному покритті.

Як зазначено у Таблиці 1, праймери ПЛР були сконструйовані для ампліфікації всіх трьох гомологічних послідовностей або для ампліфікації тільки однієї гомологічної послідовності. Наприклад, праймери ПЛР, що використовуються для ампліфікації транскрибованої ділянки гена AHAS, були сконструйовані для одночасної ампліфікації всіх трьох гомологічних копій в одній мультиплексній реакції ПЛР. Праймери ПЛР, що використовуються для ампліфікації нетранскрибованої ділянки, були або призначеними для ампліфікації усіх трьох гомологічних копій, або для ампліфікації тільки однієї гомологічної копії. Усі праймери ПЛР були сконструйовані як такі, що мають розмір від 18 до 27 нуклеотидів в довжину і мають температуру плавлення від 60 до 65°C, при оптимальній температурі 63°C. Крім того, кілька праймерів були сконструйовані для позиціонування передостанньої основи (яка містить фосфоротіоатний зв'язок та є позначеною в Таблиці 1 зірочкою [*]) над варіацією нуклеотидної послідовності, яка відрізняється генними копіями від кожного субгеному пшениці. Таблиця 1 приводить праймери ПЛР, які були сконструйовані та синтезовані.

Таблиця 1

Послідовності праймерів, що використовуються для ПЛР ампліфікації AHAS послідовностей

Назва праймера	Ділянка	Ампліфікований геном	SEQ ID NO.	Послідовність (5' →3')
AHAS-p_ прямий5	5' нетранс.	D	7	TCTGTAAGTTATCGCCTGAATTGCTT
AHAS-p_ зворотний6	5' нетранс.	D	8	CATTGTGACATCAGCATGACACAA
AHAS-p_прямий4	5' нетранс.	D	9	AAGCAYGGCTTGCCTACAGC
AHAS-p_ зворотний3	5' нетранс.	D	10	AACCAAATRCCCCTATGTCTCTCC
AHAS-p_прямий1	5' нетранс.	A, B та D	11	CGTTCGCCCGTAGACCATTC
AHAS-p_ зворотний1	5' нетранс.	A, B та D	12	GGAGGGGTGATGKTTTTGTCTTT
AHAS_1F1_ транскрибований	код.	A, B та D	13	TCG CCC AAA CCC TCG CC
AHAS_1R1_ транскрибований	код.	A, B та D	14	GGG TCG TCR CTG GGG AAG TT
AHAS_2F2_ транскрибований	код.	A, B та D	15	GCC TTC TTC CTY GCR TCC TCT GG
AHAS_2R2_ транскрибований	код.	A, B та D	16	GCC CGR TTG GCC TTG TAA AAC CT
AHAS_3F1_ транскрибований	код.	A, B та D	17	AYC AGA TGT GGG CGG CTC AGT AT
AHAS_3R1_ транскрибований	код.	A, B та D	18	GGG ATA TGT AGG ACA AGA AAC TTG CAT GA
AHAS-6A.PS.3'.F1	3' нетранс.	A	19	AGGGCCATACTTGTTGGATATCAT*C
AHAS-6A.PS.3'.R2	3' нетранс.	A	20	GCCAACACCCTACACTGCCTA*T
AHAS-6B.PS.3'.F1	3' нетранс.	B	21	TGCGCAATCAGCATGATACC*T
AHAS-6B.PS.3'.R1	3' нетранс.	B	22	ACGTATCCGCAGTCGAGCAA*T
AHAS-6D.PS.3'.F1	3' нетранс.	D	23	GTAGGGATGTGCTGTCATAAGAT*G
AHAS-6D.PS.3'.R3	3' нетранс.	D	24	TTGGAGGCTCAGCCGATCA*C

нетранс. = нетрансльована ділянка
код. = праймери, сконструйовані для транскрибованих ділянок
зірочка (*) вказує на введення фосфоротіоатної послідовності

Специфічна для субгенома ампліфікація була досягнута при використанні ПЛР у режимі вкл./викл. (Yang та ін., (2005) Biochemical and Biophysical Research Communications 328: 265-72) з праймерами, які конструювали для позиціонування передостанньої основи (що містить фосфоротіоатний зв'язок), у порівнянні з варіацією нуклеотидної послідовності, що відрізняється копіями гена з кожного субгеному пшениці. Два різні набори умов проведення ПЛР використовували для ампліфікації гомологічних копій гена AHAS з культивару Bobwhite MPB26RH. Для транскрибованих ділянок реакційна суміш для ПЛР містила 0,2 мМ дНТФ, 1 X IMMOLASE PCR™ буфер (Bioline, Taunton, MA), 1,5 мМ $MgCl_2$, 0,25 одиниць IMMOLASE DNA POLYMERASE™ (Bioline, Taunton, MA), 0,2 мкМ кожного з прямого та зворотного праймерів та приблизно 50 нг геномної ДНК. До реакційних сумішей, що містять AHAS_1F1 та AHAS_1R1 праймери, додавали 8% (об./об.) ДМСО. Для нетраскрибованих ділянок реакційні суміші ПЛР містили 0,2 мМ дНТФ, 1 X буфера PHUSION GC BUFFER™ (New England Biolabs Ipswich, MA), 0,5 одиниць HOT-START PHUSION DNA™ полімерази (New England Biolabs), 0,2 мкМ кожного із прямого та зворотного праймерів та приблизно 50 нг геномної ДНК. ПЛР проводи у заключному об'ємі реакції 25 мкл при використанні MJ PTC200® ампліфікатора (BioRad, Hercules, CA). Після проведення циклів ПЛР продукти реакції очищали та клонували при використанні PGEM-T EASY VECTOR™ (Promega, Madison, WI) у клітинах E.coli JM109. Плазмідну ДНК екстрагували при використанні набору DNAEASY PLASMID DNA PURIFICATION KIT™ (Qiagen, Valencia, CA) та піддавали секвенуванню за Сенгером при використанні BIGDYE® v3.1 способу (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) на ABI3730XL® автоматизованій платформі для проведення капілярного електрофорезу. Аналіз послідовності, який здійснювали при використанні SEQUENCHER SOFTWARE™ (GeneCodes, Ann Arbor, MI), використовували для одержання консенсусної послідовності для кожної копії гомологічного гена (SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 та SEQ ID NO:27) з культивару Bobwhite MPB26RH. CLUSTALW™ використовували для одержання множинного вирівнювання консенсусних послідовностей, для яких підтверджували те, що варіація гомологічної послідовності відрізняється між копіями гена AHAS.

Приклад 2: Конструювання зв'язувальних доменів "цинкових пальців", специфічних для послідовностей гена AHAS

Білки "цинкових пальців", направлені проти ідентифікованих послідовностей ДНК гомологічних копій генів AHAS, конструювали так, як було описано раніше. Див., наприклад, Urnov та ін., (2005) Nature 435:646-551. Типова цільова послідовність та спіралі впізнання є представленими у Таблиці 2 (конструкції ділянок спіралей впізнання) та Таблиці 3 (сайти-мішені). У Таблиці 3 нуклеотиди у сайті-мішені, що контактують за допомогою ZFP спіралей впізнання, є позначеними великими літерами; нуклеотиди, які не контактують, позначені маленькими літерами. Сайти-мішені нуклеази "цинкових пальців" (ZFN) знаходяться у 4 ділянках у гені AHAS: ділянка розміром приблизно 500 п.о., що знаходиться вище від амінокислотного залишку серину 653, вище ділянки, яка межує (у межах 30 п.о.) з амінокислотним залишком серину 653, вище ділянки, яка межує (у межах 80 п.о.) з амінокислотним залишком серину 653, та ділянка розміром приблизно 400 п.о., що розміщена нижче амінокислотного залишку серину 653.

Таблиця 2

Конструкції "цинкових пальців" AHAS (н/з означає "не застосовується")

ZFP#	F1	F2	F3	F4	F5	F6
29964	QSSHLTR SEQ ID NO:181	RSDDLTR SEQ ID NO:182	RSDDLTR SEQ ID NO:182	YRWLLRS SEQ ID NO:183	QSGDLTR SEQ ID NO:184	QPHKRTL SEQ ID NO:185
29965	RSDNLSV SEQ ID NO:186	QKINLQV SEQ ID NO:187	DDWNLSQ SEQ ID NO:188	RSANLTR SEQ ID NO:189	QSGHLAR SEQ ID NO:190	NDWDRRV SEQ ID NO:191
29966	RSDDLTR SEQ ID NO:182	YRWLLRS_ SEQ ID NO:183	QSGDLTR SEQ ID NO:184	QPHKRTL_ SEQ ID NO:185	RSDHLSQ_ SEQ ID NO:192	DSSTRKK SEQ ID NO:193
29967	RSDDLTR SEQ ID NO:182	YRWLLRS_ SEQ ID NO:183	QSGDLTR SEQ ID NO:184	QPHKRTL SEQ ID NO:185	RSDVLSE SEQ ID NO:194	DRSNRIK SEQ ID NO:195

ZFP#	F1	F2	F3	F4	F5	F6
29968	RSDNLSN SEQ ID NO:196	TSSSRIN SEQ ID NO:197	DRSNLTR SEQ ID NO:198	QSSDLSR SEQ ID NO:199	QSAHRKN SEQ ID NO:200	H/3
29969	DRSHLTR SEQ ID NO:201	QSGHLSR SEQ ID NO:202	RSDNLSV SEQ ID NO:186	QKINLQV SEQ ID NO:187	DDWNLSQ SEQ ID NO:188	RSANLTR SEQ ID NO:189
29970	QSGDLTR SEQ ID NO:184	QPHKRTL SEQ ID NO:185	RSDVLSE SEQ ID NO:194	DRSNRIK SEQ ID NO:195	RSDNLSE SEQ ID NO:203	HSNARKT SEQ ID NO:204
29971	DRSHLTR SEQ ID NO:201	QSGHLSR SEQ ID NO:202	RSDNLSN SEQ ID NO:196	TSSSRIN SEQ ID NO:197	DRSNLTR SEQ ID NO:198	H/3
29730	TSGNLTR SEQ ID NO:205	HRTSLTD SEQ ID NO:206	QSSDLSR SEQ ID NO:199	HKYHLRS SEQ ID NO:207	QSSDLSR SEQ ID NO:199	QWSTRKR SEQ ID NO:208
29731	RSDVLSE SEQ ID NO:194	SPSSRRT SEQ ID NO:209	RSDTLSE SEQ ID NO:210	TARQRNR SEQ ID NO:211	DRSHLAR SEQ ID NO:212	H/3
29732	RSDSLSA SEQ ID NO:213	RSDALAR SEQ ID NO:214	RSDDLTR SEQ ID NO:182	QKSNLSS SEQ ID NO:215	DSSDRKK SEQ ID NO:216	H/3
30006	TSGNLTR SEQ ID NO:205	WWTSRAL SEQ ID NO:217	DRSDLSR SEQ ID NO:218	RSDHLSE SEQ ID NO:219	YSWRLSQ SEQ ID NO:220	H/3
30008	RSDSLSV SEQ ID NO:221	RNQDRKN SEQ ID NO:222	QSSDLSR SEQ ID NO:199	HKYHLRS SEQ ID NO:207	QSGDLTR SEQ ID NO:184	H/3
29753	QSGNLAR SEQ ID NO:223	DRSALAR SEQ ID NO:224	RSDNLST SEQ ID NO:225	AQWGRTS SEQ ID NO:226	H/3	H/3
29754	RSADLTR SEQ ID NO:227	TNQNRIT SEQ ID NO:228	RSDSLLR SEQ ID NO:229	LQHHLTD SEQ ID NO:230	QNATRIN SEQ ID NO:231	H/3
29769	QSGNLAR SEQ ID NO:223	DRSALAR SEQ ID NO:224	RSDNLST SEQ ID NO:225	AQWGRTS SEQ ID NO:226	H/3	H/3
29770	QSGDLTR SEQ ID NO:184	MRNRLNR SEQ ID NO:232	DRSNLSR SEQ ID NO:233	WRSCRSA SEQ ID NO:234	RSDNLSV SEQ ID NO:186	H/3
30012	HSNARKT SEQ ID NO:204	QSGNLAR SEQ ID NO:223	DRSALAR SEQ ID NO:224	RSDNLST SEQ ID NO:225	AQWGRTS SEQ ID NO:226	H/3
30014	HSNARKT SEQ ID NO:204	QSGNLAR SEQ ID NO:223	DRSALAR SEQ ID NO:224	RSDHLSQ SEQ ID NO:192	QWFGRKN SEQ ID NO:235	H/3
30018	QSGDLTR SEQ ID NO:184	MRNRLNR SEQ ID NO:232	DRSNLSR SEQ ID NO:233	WRSCRSA SEQ ID NO:234	QRSNLDS SEQ ID NO:34	H/3
29988	QSGDLTR SEQ ID NO:184	QWGTRYR SEQ ID NO:33	DRSNLSR SEQ ID NO:233	HNSSLKD SEQ ID NO:32	QSGNLAR SEQ ID NO:223	H/3
29989	RSDVLSA SEQ ID NO:31	RNDHRIN SEQ ID NO:30	RSDHLSQ SEQ ID NO:192	QSAHRTN SEQ ID NO:29	DRSNLSR SEQ ID NO:233	DSTNRYR SEQ ID NO:28

Таблиця 3

Сайти-мішені для "цинкових пальців"AHAS

ZFP	Ділянка AHAS	Сайт-мішень (5'→3')	SEQ ID NO:
29964	500 п.о. вище від S653	ggATAGCAtATTGCGGCGGGAtggcctc	35
29965	500 п.о. вище від S653	gtACTGGAtGAGCTGaCAAAAGgggagg	36
29966	500 п.о. вище від S653	gtACCTGGATAGCAtATTGCGgcgggat	37
29967	500 п.о. вище від S653	agTACCTGgATAGCAtATTGCGgcggga	38
29968	500 п.о. вище від S653	gaTGAGCTGACAAAAGGggaggcgatca	39
29969	500 п.о. вище від S653	atGAGCTGaCAAAAGgGGAGGCgatcat	40
29970	500 п.о. вище від S653	tcATCCAGTACCTGgATAGCAtattgcg	41
29971	500 п.о. вище від S653	ctGACAAAAGGGGAGGCgatcattgcca	42
29730	У межах 30 п.о. вище від S653	agGCAGCACGTGCTCCTGATgcgggact	43
29731	У межах 30 п.о. вище від S653	taGGCAGCACGtgCTCCTGatgcgggac	44
29732	У межах 30 п.о. вище від S653	gaTCCCAAGCGGTGGTGctttcaaggac	45
30006	У межах 30 п.о. вище S653	tgATGCGGGACTATGATatccaacaagt	46
30008	У межах 30 п.о. вище S653	gaGCACGTGCTgCCTATGatcccaagcg	47
29753	У межах 80 п.о. нижче від S653N	tcTTGTAGGTCGAAatttcagtacgagg	48
29754	У межах 80 п.о. нижче від S653N	ctACAAGTGTGaCATGCGcaatcagcat	49
29769	У межах 80 п.о. нижче від S653N	cTTGTAGGTCGAAa	50
29770	У межах 80 п.о. нижче від S653N	cAAGTGTGACaTGCGCAa	51
30012	У межах 80 п.о. нижче від S653N	tcTTGTAGGTCGAAATTtcagtacgagg	52
30014	У межах 80 п.о. нижче від S653N	tcTTGTAGGTCGAAATTtcagtacgagg	53
30018	У межах 80 п.о. нижче від S653N	taCAAgTGTGACaTGCGCAatcagcatg	54
29988	400 п.о. нижче від S653	caGAACCTGACACAGCAgacatgtaaag	55
29989	400 п.о. нижче від S653	atAACGACCGATGGAGGGTGgtcggcag	56

Конструкції "цинкових пальців" AHAS вбудовували в експресійні вектори "цинкових пальців", що кодують білок, який має принаймні один палець зі структурою CCHC. Див., публікацію патентної заявки США № 2008/0182332. Зокрема, останній палець у кожному білку мав CCHC каркас для спіралі впізнання. Послідовності, що кодують неканонічні "цинкові пальці", зливали з доменом нуклеази типу IIS рестрикційного ферменту FokI (амінокислоти 384-579 послідовності Wah та ін., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10564-10569) при використанні лінкера ZC, що містить чотири амінокислоти та opaque-2 сигнал ядерної локалізації, що походить від Zea mays, з утворенням AHAS нуклеази "цинкових пальців" (ZFN). Див., патент США № 7,888,121.

Оптимальні "цинкових пальці" перевіряли на розщеплювальну активність при використанні перспективної системи на основі дріжджів, яка була продемонстрована для ідентифікації активної нуклеази. Див., наприклад, публікацію патентної заявки США № 2009/0111119; Doyon та ін., (2008) Nat Biotechnology 26:702-708; Geurts та ін., (2009) Science 325: 433. "Цинкові пальці" для різних функціональних доменів відбирали для застосування in vivo. Для великої кількості ZFN, які були сконструйовані, одержані та проаналізовані на зв'язування з путативними геномними полінуклеотидними сайтами-мішенями AHAS, 13 ZFN були ідентифіковані як такі, що мають in vivo активність на високому рівні, вони були відібрані для подальшого дослідження. Одинадцять ZFN конструювали для зв'язування з трьома копіями гомологічних генів, а два ZFN (29989-2A-29988 та 30006-2A-30008) конструювали тільки для зв'язування з копією гена на хромосомі 6D. 13 ZFN було охарактеризовано як такі, що є здатними до ефективного зв'язування та розщеплення унікальних геномних полінуклеотидних сайтів-мішеней AHAS in

planta. Типові вектори є описаними нижче.

Приклад 3: Оцінка розщеплення нуклеазою "цинкових пальців" генів AHAS при використанні транзієнтних аналізів

Зборка ZFN конструкції

Плазмідні вектори, що містять експресійні конструкції гену ZFN, які були ідентифіковані при використанні дріжджового аналізу, як описується у Прикладі 2, конструювали та збирали при використанні навичок та методик, що є загальновідомими з рівня техніки. Кожну послідовність, що кодує ZFN, зливали з послідовністю, яка кодує opaque-2 сигнал ядерної локалізації (Maddaloni та ін., (1989) Nuc. Acids Res. 17:7532), що розміщується вище від нуклеази "цинкових пальців".

Експресія злитих білків направляється при використанні конститутивного промотора з убіквітинового гена Zea mays, який включає 5' нетрансльовану ділянку (UTR) (Toki та ін., (1992) Plant Physiology 100;1503-07). Експресійна касета також включала 3'UTR (що включає термінатор транскрипції та сайт поліаденілування) з гена пероксидази Zea mays (Per5) (публікація патентної заявки США № 2004/0158887). Здатний до самогідролізу 2A, що кодується нуклеотидною послідовністю з вірусу Thosea asigna (Szymczak та ін., (2004) Nat Biotechnol. 22:760-760), додавали між двома злитими білками нуклеази "цинкових пальців" для клонування у конструкцію.

Поєднували плазмідні вектори при використанні IN-FUSION™ Advantage Technology (Clontech, Mountain View, CA). Ендонуклеази рестрикції одержували з New England BioLabs (Ipswich, MA), а ДНК лігази T4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) використовували для лігування ДНК. Одержання плазмід проводили при використанні набору плазмід NUCLEOSPIN® (Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, PA) або Plasmid Midi Kit (Qiagen) у відповідності з інструкціями постачальників. Фрагменти ДНК ізолювали при використанні набору QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT™ (Qiagen) після проведення електрофорезу в агарозному гелі з трис-ацетатом. Колонії, які одержували в результаті реакції лігування, спочатку піддавали скринінгу шляхом рестрикційного перетравлювання при використанні miniprepДНК. Плазмідну ДНК вибраних клонів піддавали секвенуванню за допомогою комерційного постачальник послуг секвенування (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL). Дані стосовно послідовності поєднували та піддавали аналізу при використанні програмного забезпечення SEQUENCHER™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI).

Одержані 13 плазмідних конструкцій, що являли собою: pDAB109350 (ZFNs 29732-2A-29730), pDAB109351 (ZFNs 29732-2A-29731), pDAB109352 (ZFNs 29753-2A-29754), pDAB109353 (ZFNs 29968-2A-29967), pDAB109354 (ZFNs 29965-2A-29964), pDAB109355 (ZFNs 29968-2A-29966), pDAB109356 (ZFNs 29969-2A-29967), pDAB109357 (ZFNs 29971-2A-29970), pDAB109358 (ZFNs 29989-2A-29988), pDAB109359 (ZFNs 30006-2A-30008), pDAB109360 (ZFNs 30012-2A-30018), pDAB109361 (ZFNs 30014-2A-30018) та pDAB109385 (ZFNs 29770-2A-29769), підтверджували за допомогою перетравлювання рестрикційними ферментами та шляхом ДНК секвенування.

Репрезентативні плазміди pDAB109350 та pDAB109360 є представленими на Фігурі 1 та Фігурі 2.

Одержання ДНК з конструкцій ZFN для трансфекції

Перед введенням у протопласти Triticum aestivum плазмідну ДНК для кожної конструкції ZFN одержували з культур E. coli при використанні системи PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM® (Promega Corporation, Madison, WI) або набору PLASMID MAXI KIT® (Qiagen, Valencia, CA) у відповідності з інструкціями постачальників.

Ізоляція протопластів мезофілу рослин пшениці

Протопласти мезофілу з лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH готували до трансфекції при використанні опосередкованої поліетиленгліколем (ПЕГ)-доставки ДНК, як описується нижче.

Поверхню зрілого насіння стерилізували шляхом занурення у 80% (об./об.) етанол на 30 секунд, промивання двічі водопровідною водою з наступним промиванням у 20% DOMESTOS® (0,8% об./об. доступного хлору) на ротаційному шюттель-апараті за швидкості 140 обертів на хвилину протягом 20 хвилин. DOMESTOS® видаляли шляхом декантації та насіння промивали чотири рази стерильною водою. Надлишок води видалили шляхом розміщення насіння на фільтрувальному папері WHATMAN™. Насіння поміщали в стерильну чашку з декількома зволоженими стерильними аркушами фільтрувального паперу WHATMAN™ та інкубували протягом 24 год. при 24°C. Після інкубації повторно стерилізували поверхню насіння у 15% DOMESTOS® при струшуванні та з наступним промиванням у стерильній воді, як описано вище. Насіння поміщали на тверде середовище Мурасіге та Скуга (MS) на 24 години при 24°C. На

завершення, втретє стерилізували поверхню насіння у 10% DOMESTOS® при струшуванні протягом 10 хв., з наступним промиванням у стерильній воді, як описано вище. Насіння помішали стороною з бороздкою вниз на МС тверде середовище з 10 насінинами у чашці Петрі та пророщували у темряві при 24°С протягом 14-21 днів.

Приблизно 2-3 грами листового матеріалу з пророслого насіння розрізали на фрагменти довжиною 2-3 см та поміщали у попередньо зважену чашку Петрі. Відкидали листову оболонку та пожовтілий матеріал листя. Вводили за допомогою піпетки приблизно 10 мл суміші для ферментативного перетравлювання листя (0,6 М маніту, 10 мМ MES, 1,5% ваг./об. целюлази R10, 0,3% ваг./об. мацерозиму, 1 мМ $CaCl_2$, 0,1% бичачого сироваткового альбуміну, 0,025% об./об. плюронілової кислоти, 5 мМ β-меркаптоетанолу, pH 5,7) у чашку Петрі та листовий матеріал подрібнювали в поперечному напрямку на сегменти розміром 1-2 мм за допомогою гострого скальпеля. Листовий матеріал подрібнювали у присутності суміші для перетравлювання листя, щоб запобігти пошкодженню клітин в результаті висихання листового матеріалу. Додавали додаткову кількість суміші для перетравлювання листя в чашки Петрі до одержання об'єму 10 мл на грам сирої ваги листового матеріалу та піддавали впливу вакуумметричного тиску (20" Hg) протягом 30 хв. Чашку Петрі закривали при використанні плівки Parafilm® та інкубували при температурі 28°С при обережному струшуванні з обертання протягом 4-5 годин.

Протопласти мезофілу, які одержують із листових сегментів у ферментативній суміші для перетравлювання, відокремлювали від рослинних дебрисів шляхом пропускання суспензії, одержаної в результаті перетравлення, через сито з розміром отворів 100 мікрон у пробірку для збирання на 50 мл. Для того, щоб максимізувати вихід, перетравлений матеріал листя тричі промивали. Кожне промивання проводили шляхом додання 10 мл промивного буфера (20 мМ KCl, 4 мм MES, 0,6 М маніту, pH 5,6) до чашки Петрі, обережного струшування протягом 1 хв. з подальшим пропусканням буфера для промивання через сито з розміром отворів 100 мкм у ту саму пробірку на 50 мл. Після цього відфільтровану суспензію протопластів пропускали через сито з розміром отворів 70 мікрон, а потім через сито - 40 мкм. Після цього 6 мл аліквоти відфільтрованої суспензії протопластів переносили у центрифужні пробірки з круглим дном з кришками на 12 мл та центрифугували при 70 g. та 12°С протягом 10 хв. Після центрифугування видаляли супернатант, та кожний осад протопластів ресуспендували в 7 мл промивного буфера. Вдруге осаджували протопласти центрифугуванням, як описано вище. Кожний з осадів ресуспендували в 1 мл промивного буфера та зливали у дві центрифужні пробірки. Об'єм промивного буфера доводили до кінцевого об'єму 7 мл в кожній пробірці перед проведенням центрифугування, як описано вище. Після видалення супернатанту осад протопластів ресуспендували в 1 мл промивного буфера та поєднували в одній пробірці. Вихід протопластів мезофілу оцінювали при використанні гемоцитометра Нейбауера. Синій барвник Еванса використовували для визначення частки виділених живих клітин.

Опосередкована ПЕГ трансфекція протопластів мезофілу

Приблизно 10^6 протопластів мезофілу додавали до пробірки з круглим дном на 12 мл та осаджували шляхом центрифугування при 70 g перед видаленням супернатантів. Протопласти обережно ресуспендували у 600 мкл буфера для промивання, що містить 70 мкг плазмідної ДНК. Плазмідна ДНК складалася з конструкції нуклеази "цинкових пальців", як описано вище. Після цього повільно додавали рівний об'єм 40% розчину ПЕГ (40% ваг./об. ПЕГ 4000, 0,8 М маніту, 1 М $Ca(NO_3)_2$, pH 5,6) до суспензії протопластів з одночасним обережним перемішуванням при обертанні пробірки. Суспензії протопластів інкубували протягом 15 хв. при кімнатній температурі без будь-якого перемішування.

Додатковий об'єм 6 мл промивного буфера повільно додавали до суспензії протопластів у послідовних аліквотах 1 мл, 2 мл та 3 мл. Одночасне обережне перемішування використовували для підтримання гомогенної суспензії при використанні кожної наступної аліквоти. Половину суспензії протопластів переносили у другу пробірку на 12 мл з круглим дном та повільно додавали додаткові 3 мл об'єму промивного буфера в кожну пробірку при одночасному обережному перемішуванні. Протопласти осаджували шляхом центрифугування при 70 g протягом 10 хв., і видаляли супернатант. Кожний осад протопластів ресуспендували в 1 мл промивного буфера перед тим, як протопласти з парних циклів пробірок з круглим дном, поєднували в одній пробірці на 12 мл. Додавали додаткові 7 мл промивного буфера до поєднаних протопластів перед центрифугуванням, як описано вище. Супернатант повністю видаляли, і осад протопластів ресуспендували в 2 мл середовища Цяо (0,44% ваг./об. середовище Мурасіге та Скуга плюс вітаміни, 3 мМ MES, 0,0001% ваг./об. 2,4-D, 0,6 М глюкози, pH 5,7). Суспензію протопластів переносили у стерильну чашку Петрі діаметром 3 см та інкубували у темряві протягом 24°С протягом 72 год.

Ізоляція геномної ДНК з протопластів мезофілу

Трансфіковані протопласти переносили з чашки Петрі діаметром 3 см у мікроцентрифужну пробірку на 2 мл. Клітини осаджували центрифугуванням при 70 g та видаляли супернатант. Щоб максимізувати відновлення трансфікованих протопластів, чашки Петрі промивали три рази при використанні 1 мл промивного буфера. Кожен змив проводили шляхом збовтування промивного буфера в чашці Петрі протягом 1 хв., а подальшого перенесення рідини у ту ж саму пробірку на 2 мл. Наприкінці кожного промивання клітини осаджували шляхом центрифугуванням при 70 g та видаляли надосадову рідину. Осаджені протопласти заморожували в рідкому азоті перед висушування заморожуванням протягом 24 годин у Labconco Freezone 4.5® (Labconco, Kansas City, MO) при -40°C та тиску 133 x 10^{-3} мбар. Ліофілізовані клітини піддавали екстракції ДНК з використанням набору DNEASY® PLANT DNA EXTRACTION MINI KIT (Qiagen) згідно з інструкціями виробника, за винятком того, що руйнування тканини не є необхідним, та клітини протопластів додавали безпосередньо до літичного буфера.

Аналіз ПЛР геномної ДНК протопластів для ZFN послідовності розщеплення

Для того, щоб дозволити дослідити ефективність розщеплення та сайт-специфічність ZFN, сконструйованих для оцінки локусу гена AHAS, створювали ПЛР праймери для ампліфікації фрагменту до 300 п.о., який охоплює один або більше сайтів-мішеней для ZFN. Один з праймерів був сконструйований для того, щоб знаходитися у межах вікна розміром 100 п.о., що охоплює цільовий(і) сайт(и) для ZFN Така стратегія конструювання дозволили використовувати методику секвенування коротких фрагментів Illumina для оцінки цілісності сайту-мішені ZFN у трансфікованих протопластах. Крім того, ПЛР праймери конструювали для ампліфікації трьох гомологічних копій гена AHAS та для охоплення варіації нуклеотидної послідовності, що відрізняється між гомологами, так, що зчитування послідовностей Illumina може бути однозначно приписане до субгеному пшениці, з якого вони були отримані.

Загалом конструювали чотири набори праймерів ПЛР для ампліфікації локусів сайту-мішені ZFN (Таблиця 4). Кожний набір праймерів був синтезований з послідовностями Illumina SP1 та SP2 на 5' кінці прямого та зворотного праймерів, відповідно, для забезпечення сумісності з методиками секвенування коротких фрагментів Illumina. Синтезовані праймери містили фосфоротіоатний зв'язок на передостанніх 5' та 3' нуклеотидах (позначені у Таблиці 4 зірочкою [*]). 5' фосфоротіоатний зв'язок забезпечував захист від екзонуклеазної деградації послідовностей Illumina SP1 та SP2, у той час як 3' фосфоротіоатний зв'язок поліпшував специфічність ПЛР для ампліфікації цільових послідовностей AHAS при використанні ПЛР у режимі вкл./викл. (Yang та ін., (2005)). Усі праймери ПЛР конструювали як такі, що містили від 18 до 27 нуклеотидів у довжину та мали температуру плавлення від 60 до 65°C, оптимально 63°C.

У Таблиці 4 нуклеотиди, специфічні для гену AHAS, є позначеними великими літерами; нуклеотиди, що відповідають Illumina SP1 та SP2 послідовностям, є позначеними маленькими літерами. Кожний набір праймерів піддавали емпіричному аналізу для ампліфікації трьох гомологічних копій гену AHAS за допомогою секвенування за Сенгером продуктів ПЛР ампліфікації.

Таблиця 4

Послідовності праймерів, що використовуються для оцінки ефективності розщеплення AHAS ZFN та специфічності для сайту-мішені

Назва праймера	AHAS ділянка	Послідовність праймера (5'→3')	SEQ ID NO:
AHAS-500ZFN.F3	500 п.о. вище від S653	a*cactctttccctacacgacgctcttccgatctTCCTCTAGGATTCAAGACTTTTG*G	57
AHAS-500ZFN.R1	500 п.о. вище від S653	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctCGTGGCCGCTTGTAAGTGTA*A	58
AHASs 653ZFN.F1	У межах 30 п.о. вище від S653	a*cactctttccctacacgacgctcttccgatctGAGACCCCAGGGCCATACTT*G	59
AHASs 653ZFN.R3	У межах 30 п.о. вище від S653	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctCAAGCAAACTAGAAAACGCATG*G	60
AHASs 653ZFN.F5	У межах 80 п.о. нижче від S653N	a*cactctttccctacacgacgctcttccgatctATGGAGGGTGATGGCAGGA*C	61
AHASs 653ZFN.R1	У межах 80 п.о. нижче від S653N	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctATGACAGCACATCCCTACAAAAG*A	62
AHAS+ 400ZFN.F1	400 п.о. нижче від S653	a*cactctttccctacacgacgctcttccgatctAACAGTGTGCTGGTTCCTTTCT*G	63
AHAS+ 400ZFN.R3	400 п.о. нижче від S653	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctTYTYYCCTCCCAACTGTATTCAG*A	64

зірочка (*) використовується для позначення фосфоротіоату

ПЛР ампліфікацію локусу сайту-мішені ZFN з геномної ДНК, екстрагованої з трансфікованих протопластів мезофілу рослин пшениці, використовували для одержання відповідних специфічних для локусу молекул ДНК у правильному форматі для методики секвенування шляхом синтезу на основі Illumina. Кожний ПЛР аналіз оптимізували для роботи на 200 нг вихідної ДНК (приблизно 12500 клітинних еквівалентів геному Triticum aestivum). Множинні реакції здійснювали на кожному трансфікованому зразку для забезпечення достатньої кількості копій геному Triticum aestivum та піддавали аналізу для достовірної оцінки ефективності ZFN та специфічності для сайту-мішені. Проводили приблизно 16 ПЛР аналізів, еквівалентних 200000 копіям геному Triticum aestivum, узятого з індивідуальних протопластів, на один трансфікований зразок. Одну ПЛР вихідну суміш (мастер-мікс) готували для кожного трансфікованого зразка. Для забезпечення оптимальної ПЛР ампліфікації ZFN сайту-мішені (тобто, для того, щоб

запобігти реагентам ПЛР стати обмежуючим фактором та для забезпечення того, щоб ПЛР залишалася на стадії експоненціальної ампліфікації) вихідний аналіз проводили при використанні способу кількісної ПЛР для визначення оптимальної кількості циклів для проведення аналізу на цільовій тканині. Початкову ПЛР проводили з необхідними негативними контрольними реакціями на MX3000P AMPLIFICATOR™ (Stratagene). З одержаних даних, які були отримані при проведенні ПЛР, відносне підвищення флуоресценції представляли від циклу до циклу та визначали кількість циклів на аналіз, що буде забезпечувати достатню ампліфікацію, одночасно не дозволяючи, щоб реакція стала обмеженою реагентами, у спробі зменшити надмірну кількість циклів та необ'єктивну ампліфікацію загальних молекул. Мастер-мікс, що залишилася невикористаною, залишали на льоду до тих пір, поки не був завершений кількісний аналіз ПЛР, і визначали оптимальну кількість циклів. Невикористану кількість мастер-мікс потім розділяли на аліквоти у бажану кількість реакційних пробірок. (приблизно 16 ZFN аналізів) і ПЛР ампліфікацію проводили протягом оптимальної кількості циклів. Після ампліфікації зразки для того самого сайту-мішені ZFN об'єднували разом та 200 мкл поєднаного продукту на ZFN очищали при використанні набору QIAQUICK MINIELUTE PCR PURIFICATION KIT™ (Qiagen) у відповідності з інструкціями виробника.

Для того, щоб дозволити провести секвенування зразка при використанні методики секвенування коротких фрагментів Illumina, проводили додатковий цикл ПЛР для введення послідовностей Illumina P5 та P7 в ампліфіковані фрагменти ДНК, при цьому також можна використовувати послідовність штрихового коду для однозначного віднесення фрагментів послідовності до зразка, з якого вона походить. Це може бути досягнуто при використанні праймерів, які частково є комплементарними до SP1 та SP2 послідовностей, які додають у першому циклі ампліфікації, а також містять індекс зразка та послідовності P5 та P7. Оптимальну кількість ПЛР, що є необхідною для додання додаткових послідовностей до матриці за відсутності надмірної ампліфікації спільних фрагментів, визначали за допомогою циклу кількісного ПЛР аналізу, як описується вище. Після ампліфікації одержаний продукт очищали при використанні AMPURE MAGNETIC BEADS® (Beckman-Coulter) зі співвідношенням ДНК до частинок 1:1,7. Очищений ДНК фрагмент титрували для секвенування при використанні методики Illumina для коротких фрагментів при використанні ПЛР набору для кількісної оцінки бібліотеки (KAPA) у відповідності з інструкціями виробника. Зразки готували для секвенування при використанні cBot набору для генерації кластерів (Illumina) та піддавали секвенуванню на пристрої ILLUMINA GAIIx™ або HISEQ2000™ (Illumina) для одержання фрагментів послідовностей спареного кінця, що включають 100 п.о., у відповідності з інструкціями виробника.

Аналіз даних для визначення NHEJ у цільових ZFN сайтах

Після одержання даних щодо послідовностей короткого фрагменту на основі Illumina для зразка бібліотек, приготовленого для трансфікованих протопластів мезофілу, проводили біоінформативний аналіз для ідентифікації делетованих нуклеотидів у цільових сайтах ZFN. Такі делеції є відомими як ідентифікатори активності ZFN in planta, що є результатом поєднання відновлення ДНК при використанні сполучення негомологічних кінців (NHEJ).

Для ідентифікації послідовностей фрагментів з NHEJ делеціями використовували інструкції, що забезпечуються виробником, для обробки даних послідовностей, одержаних на пристрої HISEQ2000™ (Illumina), для першого розрахункового віднесення послідовностей коротких фрагментів до зразка протопластів, з якого вони були одержані. Віднесення базувалося на штриховому коді послідовності, що був введений у процесі підготовки бібліотеки, як було описано раніше. Правильне віднесення забезпечувалося у формі індексів штрихового коду з 6 п.о., що були використані для одержання бібліотек та відрізнялися від кожного іншого відмінністю у два кроки.

Після встановлення віднесення зразка фільтр для ознаки пропускали через усі послідовності. Фільтр для ознаки вводили у розроблений покупцем PERL пропис. Фрагменти послідовності виключали, якщо існувало більше, ніж три невизначені основи, або коли середнє значення Phred індексу було меншим за 20, або тоді коли існувало три або більше послідовні основи, які мали Phred індекс менший за 20, або тоді, коли фрагмент послідовності за довжиною був коротшим, ніж 40 нуклеотидів.

Після цього збалансовані за характеристиками послідовності приписували до субгеному пшениці, з якого вони походять. Це було досягнуто при використанні другого розробленого покупцем PERL пропису, в якому приписування субгеному визначали з гаплотипу варіантів нуклеотидної послідовності, які були охоплені праймерами ПЛР, що використовуються для ампліфікації трьох гомологічних копій AHAS гена, як описується вище.

На завершення визначали NHEJ делеції у сайті розщеплення ZFN у фрагментах

послідовностей субгенома з визначеним віднесенням до кожного зразка при використанні третього розробленого покупцем PERL пропису та роботи з даними у ручному режимі при використанні Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation). Цього було досягнуто шляхом підрахунку частоти унікальних NHEJ делецій у кожному субгеномі у кожному зразку.

Два підходи використовували для оцінки ефективності розщеплення та специфічності ZFN, які піддавали дослідженню. Ефективність розщеплення виражали (у частинах на мільйон фрагментів) як частку послідовностей, що приписувалися до певного субгеному, що містять NHEJ делецію у сайті-мішені ZFN. Порядок ранжирування ZFN у відповідності з їх ефективностями, які спостерігали, використовували для ідентифікації ZFN з найкращої активністю розщеплення для кожної з чотирьох ділянок-мішеней генів AHAS специфічним для субгеному чином.

Усі проаналізовані ZFN продемонстрували розподіл розміру делеції NHEJ, який є послідовним з очікуваною in planta активністю ZFN. Специфічність розщеплення виражали як співвідношення ефективностей розщеплення, які спостерігали у трьох субгеномах. Включення біологічних повторів у дані аналізу не мало суттєвого впливу на порядок ранжирування для активності розщеплення та специфічності проаналізованих ZFN.

Із цих результатів ZFN, що кодуються плазмідою pDAB109350 (тобто, ZFN 29732 та 29730) та pDAB109360 (тобто, ZFN 30012 та 30018), відбирали для in planta націлювання у подальших експериментах, беручи до уваги їх характеристики значущої активності розщеплення геномної ДНК у кожному з трьох субгеномів пшениці.

Приклад 4: Оцінка донорних конструкцій опосередкованого ZFN "редагування" AHAS гена при використанні транзієнтних аналізів

Для дослідження опосередкованого ZFN "редагування" геному в локусі ендогенного гена AHAS у пшениці було проведено ряд експериментів для оцінки впливу донорної конструкції на ефективність гомологічного рекомбінаційного (HR)-направленого та (NHEJ)-направленого (негомологічне сполучення кінців) відновлення ДНК. Ці експерименти використовували транзієнтні аналізи для моніторингу ефективності опосередкованого ZFN додання описаної раніше S653N мутації, що надає стійкості до гербіцидів класу імідазолінонів (Li та ін., (2008) Molecular Breeding 22: 217-225) у локусі ендогенного гена AHAS у пшениці, або альтернативно, опосередкованого ZFN введення сайту послідовності для EcoRI рестрикційної ендонуклеази у розрив дволанцюгової ДНК, створений в ендогенних генах AHAS за допомогою націленого ZFN розщеплення.

Донорні конструкції для HR-направленого відновлення ДНК

Конструкції донорної ДНК базувалися на плазмідному ДНК векторі, що містить 750 п.о. гомологічних плечей (тобто, послідовностей, які є ідентичними ендогенному гену AHAS), які фланкують кожну сторону сайту-мішені розщеплення для ZFN 29732 та 29730. Плазмідний ДНК вектор конструювали для кожного з трьох субгеномів пшениці: pDAS000132 (Фігура 3), pDAS000133 (Фігура 4) та pDAS000134 (Фігура 5) до A-, B- та D-геному, відповідно (SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:6 та SEQ ID NO:67). Кожний плазмідний ДНК вектор конструювали для введення S653N (AGC→ATT) мутації як геномної модифікації, що надає стійкості до гербіцидів класу імідазолінонів у цільовій гомологічній копії ендогенного гена AHAS шляхом опосередкованого ZFN HR-направленого відновлення ДНК. Дві додаткові плазмідні ДНК конструкції також конструювали для націлювання на D-геном. Перша плазмідна ДНК, pDAS000135 (SEQ ID NO: 68) (Фігура 6), була ідентичною до pDAS000134, за винятком того, що вона містила дві додаткові (синонімічні) одиничні точкові нуклеотидні мутації, одна з яких була розміщена на 15 п.о. вище та нижче від S653N мутації. Друга плазмідна ДНК, pDAS000131(SEQ ID: 69) (Фігура 7), не містила S653N мутації, але її конструювали для введення сайту впізнання EcoRI рестрикційної ендонуклеази (тобто, GAATTC) у розрив подвійної ДНК, створений шляхом цільового ZFN розщеплення у копії D-геному ендогенного гена AHAS.

Конструювання донорів для NHEJ-направленого відновлення ДНК

Два типи конструкцій донорної ДНК використовували для NHEJ-направленого відновлення ДНК.

Перший тип донорної конструкції являв собою лінійну, дволанцюгову молекулу ДНК, що включає послідовність з 41 п.о., яка є гомологічною до ендогенних генів AHAS у пшениці. Конструювали дві донорні молекули ДНК, кожна для націлювання на три гомологічні копії гена AHAS. Обидві донорні молекули ДНК мали виступаючі 5' та 3' кінці для забезпечення лігування виступів для сприяння опосередкованому NHEJ-направленому відновленню ДНК ZFN. Ці дві донорні молекули ДНК відрізнялися послідовністю на їх виступаючому 3' кінці. Першу донорну молекулу ДНК, pDAS000152 (SEQ ID NO:74 та SEQ ID NO:75), конструювали для забезпечення лігування виступів, які є сумісними з такими, які одержували шляхом розщеплення ендогенних

AHAS генів за допомогою ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350), та для одержання інсерції донорної молекули, що складається з 41 п.о., в ендогенному гені AHAS у сайті розриву подвійної ДНК при використанні NHEJ-направленого відновлення ДНК. Другу донорну молекулу ДНК pDAS000149 (SEQ ID NO: 76 та SEQ ID NO:77) конструювали для забезпечення лігування виступаючих кінців, що є сумісними з такими, які одержували шляхом подвійного розщеплення ендогенних AHAS генів за допомогою ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350) та ZFN 30012 та 30018 (що кодуються плазмідою pDAB109360), та для одержання заміщення послідовності ендогенного гена AHAS, що міститься між двома розривами подвійної ДНК, утвореними при використанні донорної молекули ZFN, що складається з 41 п.о., при використанні NHEJ-направленого відновлення ДНК.

Другий тип донора являв собою вектор на основі плазмідної ДНК, що містить послідовність з 41 п.о., яка має гомологію з ендогенними генами AHAS пшениці, та яка була фланкована з кожного боку послідовністю, яка впізнається ZFN, що використовується для створення розривів подвійної ДНК в ендогенних генах AHAS. Модель донора дозволяла in planta вивільняти унікальну послідовність, що складається з 41 п.о., з молекули плазмідної ДНК при використанні тих самих ZFN, які використовуються для розщепленні сайтів-мішеней в ендогенних генах AHAS, та одночасно одержувати виступаючі кінці, що є прийнятними для лігування виступаючих кінців вивільненої послідовності розміром 41 п.о. в ендогенних генах AHAS при використанні NHEJ-направленого відновлення ДНК. Конструювали дві молекули плазмідної донорної ДНК, кожна з яких була націлена на три гомологічні копії гена AHAS. Першу плазмідну донорну молекулу ppDAS000153 (SED ID NO:78 та SEQ ID NO:79) (Фігура 8), конструювали для забезпечення лігування виступаючих кінців на вивільненому фрагменті ДНК довжиною 41 п.о., що є сумісними з тими, які одержували шляхом розщеплення ендогенних генів AHAS при використанні ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350). Другу плазмідну донорну молекулу, pDAS000150 (SEQ ID NO:80 та SEQ ID NO:81) (Фігура 9), конструювали для забезпечення лігування виступаючих кінців на вивільненому фрагменті ДНК довжиною 41 п.о., що були на одному кінці сумісними з тими, які одержували при використанні ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350), а на іншому кінці були сумісними з тими, які одержували при використанні ZFN 30012 та 30018 (що кодуються плазмідою pDAB109360). Ця конструкція дозволяла проводити заміщення послідовності ендогенного гена AHAS, що міститься між двома розривами подвійної ДНК, утвореними при використанні ZFN 29732 та 29730 та ZFN 30012 та 30018, послідовністю донорної молекули, що містить 41 п.о.

Синтез донорної ДНК для NHEJ-направленого та HDR-направленого відновлення ДНК

Стандартні способи клонування, що є загальновідомими спеціалістам у даній галузі техніки, використовували для побудови плазмідних векторів. Перед доставкою у Triticum aestivum плазмідну ДНК для кожної донорної конструкції одержували з культур E. coli при використанні системи PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM® (Promega Corporation, Madison, WI) або набору PLASMID MAXI KIT® (Qiagen, Valencia, CA) у відповідності з інструкціями постачальників.

Стандартну фосфорамідатну хімію використовували для хімічного синтезу дволанцюгових молекул донорної ДНК (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Для кожної донорної молекули синтезували пари комплементарних олігомерів одноланцюгової ДНК, кожний з них мав два фосфоротіоатних зв'язки на їх 5' кінцях для забезпечення захисту від ендонуклеазної деградації in planta. Олігомери одноланцюгової ДНК очищали при використанні високоефективної рідинної хроматографії для збагачення на молекули повної довжини та очищали від залишків етапів хімічного синтезу при використанні Na^+ обміну. Дволанцюгова молекула донора була сформована шляхом відпалювання еквімолярних кількостей двох комплементарних одноланцюгових ДНК олігомерів при використанні стандартних способів, які є добре відомими фахівцям у даній галузі техніки. Перед доставкою у Triticum aestivum дволанцюгові молекули ДНК розводили до необхідної концентрації в стерильній воді.

Ізоляція протопластів пшениці, що мають походження від соматичних ембріогенних калусів

Протопласти, що мають походження від соматичних ембріогенних калусів (SEC) донорної лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH, готували для трансфекції при використанні опосередкованої поліетиленгліколем (ПЕГ) доставки ДНК так, як описано нижче:

Проростки донора лінії пшениці вирощували у контрольованих умовах середовища при кімнатній температурі, яка підтримувалася на рівні 18/16°C (день/ніч) та при значенні фотоперіоду 16/8 годин (день/ніч) з освітленням, що забезпечувалося на рівні 800 ммоль $м^2$ на сек. Колоски пшениці збирали на 12-14 день після цвітіння та піддавали стерилізації поверхню шляхом замочування протягом 1 хвилини в 70% (об./об.) етанолу. Колоски обмолочували та незріле насіння стерилізували протягом 15 хв. у 17% (об./об.) у розчині гіпохлориту натрію при

обережному струшуванні з наступним промиванням не менше трьох разів стерильною дистильованою водою. Ембріони в асептичних умовах видаляли з незрілого насіння під препарувальною лупою.

Цефалокаудальну вісь видаляли при використанні гострого леза скальпеля та відкидали. Щитки поміщали у чашки Петрі™ діаметром 9 см, що містили 2-4 середовище без/з TIMENTIN™ із непошкодженим щитком, орієнтованим вгору. Загалом висаджували 25 щитків на кожну чашку Петрі™ діаметром 9 см. Утворення соматичних ембріогенних калусів (SEC) було ініційоване шляхом інкубації в темряві при 24°C протягом 3 тижнів. Через 3 тижні SEC відокремлювали від не-ембріогенного калусу, поміщали на свіже 2-4 середовище без TIMENTIN™ та інкубували ще протягом 3 тижнів у темряві при температурі 24°C. Субкультивування SEC повторювали в цілому три рази, перш ніж їх використовували для підготовки протопластів.

Приблизно один грам SEC розділяли на окремі шматочки розміром 1-2 мм при використанні гострого леза скальпеля у чашці Петрі™ діаметром 10 см, що містила приблизно 10 мл суміші для перетравлювання калусів пшениці (2,5% ваг./об. целюлази RS, 0,2% ваг./об. пектоліази Y23, 0,1% ваг./об. DRISELASE®, 14 мМ $CaCl_2$, 0,8 мМ $MgSO_4$, 0,7 мМ KH_2PO_4, 0,6 М манітолу, pH 5,8) для запобігання дегідратації калусів. Додавали додаткову кількість суміші для перетравлювання калусів до чашки Петрі™ до одержання об'єму 10 мл на грам вологої ваги калусу та піддавали впливу вакуумметричного тиску (20" Hg) протягом 30 хв. Чашку Петрі™ закривали плівкою PARAFILM® та інкубували при 28°C з обережним ротаційним перемішуванням при 30-40 об./хв. протягом 4-5 годин.

SEC протопласти, відокремлені від калусу, ізолювали шляхом пропускання суспензії для перетравлювання через сито з розміром отворів 100 мікрон та збирали у пробірку на 50 мл. Для максимізації виходу протопластів перетравлений матеріал калусів три рази промивали. Кожне промивання проводили шляхом додання 10 мл SEC буфера для промивання (0,6 М манітол, 0,44% ваг./об. Мурасіге та Скуга, pH 5,8) до чашки Петрі™, обережно струшували протягом 1 хвилини, після чого пропускали SEC буфер для промивання через сито з розміром отворів 100 мікрон та збирали у ту саму пробірку на 50 мл. Після цього відфільтровану суспензію протопластів пропускали через сито з розміром отворів 70 мікрон, а після цього через сито 40 мікрон. Потім аліквоти на 6 мл відфільтрованої суспензії протопластів переносили у центрифужні пробірки на 12 мл з круглим дном з кришками та центрифугували при 70 g та температурі 12°C протягом 10 хв. Після центрифугування видаляли супернатант, залишаючи приблизно 0,5 мл супернатанту, та кожний з осадів протопластів ресуспендували у 7 мл 22% розчину сахарози. Суміш сахарози та протопластів обережно покривали 2 мл SEC буфера для промивання, впевнившись у тому, що не відбувалося змішування двох розчинів. Протопласти піддавали другому центрифугуванню так, як описується вище. Шар протопластів, який був видимим між SEC буфером для промивання та розчином сахарози, збирали при використанні піпетки та поміщали у чисту пробірку з круглим дном на 12 мл. Сім мл SEC буфера для промивання додавали до протопластів, та пробірки піддавали центрифугуванню так, як описується вище. Супернатант видаляли, та SEC протопласти поєднували в одній пробірці та ресуспендували у заключному об'ємі 1-2 мл SEC буфера для промивання. Вихід SEC протопластів оцінювали при використанні гематоцитометра Нейбауера. Забарвлювання блакитним Еванса використовували для визначення частки відновлених живих клітин.

Опосередкована ПЕГ трансфекція SEC протопластів

Додавали приблизно 2 млн. SEC протопластів до пробірки з круглим дном на 12 мл та осаджували шляхом центрифугування при 70 g перед видаленням супернатанту. Протопласти обережно ресуспендували у 480 мкл SEC буфера для промивання, що містить 70 мкг ДНК. Експеримент проводили з конструкціями ДНК, які складаються з нуклеази "цинкових пальців", та конструкціями донорної ДНК, які описані вище, при цьому кожна конструкція була присутньою у молярному співвідношенні, необхідному для експерименту. Після цього повільно додавали 720 мкл розчину 50% ПЕГ (50% ваг./об. ПЕГ 4000, 0,8 М манітол, 1 М $Ca(NO_3)_2$, pH 5,6) до суспензії протопластів з одночасним перемішуванням шляхом обережного обертання пробірки. Суспензію протопластів залишали для інкубації протягом 15 хвилин при кімнатній температурі без будь-якого перемішування.

Повільно додавали додаткові 7 мл об'єму SEC буфера для промивання до суспензії протопластів у вигляді послідовних аліквот 1 мл, 2 мл та 3 мл. Одночасне обережне перемішування використовували для підтримання гомогенної суспензії при доданні кожної послідовної аліквоти. Половину суспензії протопластів переносили до другої пробірки на 12 мл з круглим дном та повільно додавали додаткові 3 мл об'єму SEC буфера для промивання до кожної пробірки з одночасним обережним перемішуванням. Протопласти осаджували шляхом центрифугування при 70 g протягом 10 хвилин, та супернатант видаляли. Кожний з осадів

протопластів ресуспендували у 1 мл SEC буфера для промивання перед тим, як протопласти з парних пробірок з круглим дном поєднували в одній пробірці на 12 мл. Додаткові 7 мл SEC буфера для промивання додавали до поєднаних протопластів перед центрифугуванням, як описується вище. Супернатант повністю видаляли та осад протопластів ресуспендували у 2 мл середовища Цяо. Суспензії протопластів переносили у стерильну чашку Петрі™ діаметром 3 см та \ інкубували у темряві при 24°C протягом 72 годин.

Ізоляція щитків з незрілих зиготних зародків пшениці

Щитки з незрілих зиготних ембріонів пшениці донорної лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH готували для трансфекції при використанні біолістично опосередкованої доставки ДНК так, як описано нижче:

Проростки донора лінії пшениці вирощували у контрольованих умовах середовища при кімнатній температурі, яка підтримувалася на рівні 18/16°C (день/ніч) та при значенні фотоперіоду 16/8 годин (день/ніч) з освітленням, що забезпечувалося на рівні 800 ммоль $м^2$ на сек. Колоски пшениці збирали на 12-14 день після цвітіння та піддавали стерилізації поверхню шляхом замочування протягом 1 хвилини в 70% (об./об.) етанолу. Колоски обмолочували та незріле насіння стерилізували протягом 15 хв. у 17% (об./об.) у розчині гіпохлориту натрію при обережному струшуванні з наступним промиванням не менше трьох разів стерильною дистильованою водою. Ембріони в асептичних умовах видаляли з незрілого насіння під препарувальною лупою.

Цефалокаудальну вісь видаляли при використанні гострого леза скальпеля та відкидали. Щитки поміщали у чашки Петрі™ діаметром 9 см, що містили осмотичне середовище Мурасігі та Скуга (Е3 мальтоза) із непошкодженим щитком, орієнтованим вгору. Загалом висаджували 20 щитків на кожну чашку Петрі™ діаметром 9 см. Одержані таким чином зародки піддавали попередньому культивуванню у темряві при температурі 26°C мінімально протягом 4 годин перед трансфекцією при використанні біолістично опосередкованої доставки ДНК.

Трансфекція щитків з незрілих зиготних зародків пшениці при використанні біолістично опосередкованої доставки ДНК

Частинки золота для біолістично опосередкованої доставки ДНК одержували шляхом додання 40 мг частинок колоїдного золота розміром 0,6 мікрон (BioRad) до 1 мл стерильної води у мікропробірці на 1,5 мл. Частинки золота ресуспендували шляхом перемішування протягом 5 хв. Для одержання достатньої кількості матеріалу для 10 бомбардувань, аліквоту на 50 мкл суспензії частинок золота переносили у мікропробірку на 1,5 мл, що містила 5 мкг ДНК, ресуспендуваної в 5 мкл стерильної води. Після ретельного змішування шляхом інтенсивного перемішування додавали до мікропробірки 50 мкл 2,5 М $CaCl_2$ та 20 мкл 0,1 М спермідину, при ретельному перемішування після додання кожного реагенту. Вкриті ДНК частинки золота осаджували шляхом центрифугування протягом 1 хвилин при максимальній швидкості у настільній мікроцентрифузі. Супернатант видаляли та 1 мл 100% етанолу додавали для промивання та ресуспендування частинок золота. Частинки золота осаджували шляхом центрифугування, як описується вище, та відкидали супернатант. Вкриті ДНК частинки золота ресуспендували у 110 мкл 100% етанолу та витримували на льоду. Після нетривалого перемішування 10 мкл розчину частинок золота поміщали у центрі шару макроносія та залишали для висушування на повітрі.

Систему PDS-1000/HE PARTICLE GUN DELIVERY SYSTEM™ (BioRad) використовували для трансфекції щитків незрілих зиготних зародків пшениці при використанні біолістично опосередкованої доставки ДНК. Доставку вкритих ДНК частинок золота здійснювали при використанні наступних параметрів: щілина 2,5 см, щілина замикаючої пластини 0,8 см, відстань до мішені 6,0 см, вакуум 91,4 – 94,8 кПа, норма витрати всмоктування 5,0 та норма витрати рідини на виході 4,5. Щитки незрілих зиготних зародків пшениці піддавали бомбардуванню при використанні розривної діафрагми при 900 фунтів на квадратний дюйм. Кожна чашка Петрі™, що містила 20 щитків, піддавалася бомбардування один раз. Щитки, які піддавали бомбардуванню, інкубували при температурі 26°C у темряві протягом 16 годин перед перенесенням на середовище для індукції калусів. Щитки культивували на середовищі для індукції калусів у темряві при температурі 26°C протягом 7 днів.

Ізоляція геномної ДНК із SEC протопластів

Геномну ДНК екстрагували із SEC протопластів при використанні процедури, яка раніше була описана для протопластів мезофілу. Додатковий етап очистки здійснювали для зниження присутності донорної ДНК, що використовується для трансфекції. Цього досягали при використанні гель-електрофорезу для відокремлення геномної ДНК із SEC протопластів від донорної ДНК, що використовувалася для трансфекції. Екстраговану ДНК піддавали електрофорезу протягом 3 годин у 0,5% агарозному гелі при використанні 0,5X TBE. ДНК

візуалізували при використанні SYBR® SAFE забарвлювання, та вирізали смугу, що відповідає геномній ДНК із SEC протопластів. Геномну ДНК очищали з агарозного гелю при використанні набору для очищення QIAQUICK DNA PURIFICATION KIT™ (Qiagen) у відповідності з інструкціями виробника, за винятком того, що колонку QIAQUICK™ для очистки ДНК заміняли колонкою для зв'язування ДНК з набору DNEASY PLANT DNA EXTRACTION MINI KIT™ (Qiagen).

Ізоляція геномної ДНК із щитків незрілих зиготних зародків

20 щитків незрілих зиготних зародків пшениці, трансфікованих для кожної біолістичної доставки ДНК, переносили у пробірку на 15 мл та швидко заморожували у рідкому азоті перед висушування заморожуванням протягом 24 годин у LABCONCO FREEZONE 4.5® (Labconco, Kansas City, MO) при -40°C та тиску 133 x 10^{-3} мбар. Ліофілізовані калуси піддавали екстракції ДНК при використанні набору DNEASY® PLANT DNA EXTRACTION MAXI™ KIT (Qiagen) у відповідності з інструкціями виробника.

Додатковий етап очистки здійснювали для зниження присутності донорної ДНК, що використовується для трансфекції. Цього досягали при використанні гель-електрофорезу для відокремлення геномної ДНК з калусів від донорної ДНК, що використовувалася для трансфекції. Екстраговану ДНК піддавали електрофорезу протягом 3 годин у 0,5% агарозному гелі при використанні 0,5X TBE. ДНК візуалізували при використанні SYBR® SAFE забарвлювання, та смугу, що відповідає геномній ДНК із калусів, вирізали. Геномну ДНК очищали з агарозного гелю при використанні набору для очищення QIAQUICK DNA PURIFICATION KIT™ (Qiagen) у відповідності з інструкціями виробника, за винятком того, що колонку QIAQUICK™ для очистки ДНК заміняли колонкою для зв'язування ДНК з набору DNEASY PLANT DNA EXTRACTION MINI KIT™ (Qiagen).

ПЛР аналіз геномної ДНК для опосередкованого ZFN редагування AHAS

Для дослідження опосередкованого ZFN "редагування" геному в ендогенних генах AHAS пшениці при використанні HR- та NHEJ-направленого відновлення ДНК та оцінки ефекту конструкції донорної ДНК на ефективність кожного шляху відновлення ДНК, використовували ПЛР аналізи для ампліфікації ділянок-мішеней AHAS з геномної ДНК трансфікованих клітин пшениці. ПЛР аналізи проводили так, як описано раніше для одержання необхідних специфічних для локусу молекул ДНК у правильному форматі для методики секвенування шляхом синтезу на основі Illumina. Кожний аналіз здійснювали при використанні описаної раніше пари праймерів з послідовностями SEQ ID NO: 59 та SEQ ID NO: 60), які конструювали для ампліфікації ділянки націленої за допомогою ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350) та ZFN 30012 та 30018 (що кодуються плазмідою pDAB109360) для кожної з трьох гомологічних копій гена AHAS. Множинні реакції проводили для одного трансфікованого зразка для того, що впевнитися, що оцінюється достатня кількість копій геному Triticum aestivum для опосередкованого ZFN редагування гену. Для трансфікованих SEC протопластів проводили до 16 ПЛР аналізів, що є еквівалентним 200000 копіям геному Triticum aestivum, який одержували з індивідуальних протопластів, на трансфікований зразок. Для трансфікованих щитків незрілих зиготних зародків проводили приблизно 48 ПЛР аналізів, що є еквівалентним 600000 копіям геному Triticum aestivum, узятого з індивідуальних протопластів, на трансфікований зразок. Кожний трансфікований зразок одержували для секвенування при використанні набору CBOT CLUSTER GENERATION KIT™ (Illumina) та піддавали секвенуванню на пристрої ILLUMINA $GAII_X$™ або HISEQ2000™ (Illumina) для одержання фрагментів спарених кінців послідовності, що містить 100 п.о., як було описано раніше.

Аналіз даних для визначення опосередкованого ZFN HR-направленого редагування у локусі гена AHAS

Після одержання даних стосовно коротких фрагментів послідовності Illumina для зразків бібліотеки, одержаних для трансфікованих SEC протопластів та щитків незрілих зиготних зародків пшениці проводили аналізи для ідентифікації молекулярного підтвердження опосередкованого ZFN HR-направленого редагування у сайтах-мішенях для ZFN.

Для ідентифікації фрагментів послідовності для молекулярного підтвердження HR-направленого редагування гену короткі фрагменти послідовності спочатку піддавали розрахункам, як описано раніше, для віднесення кожного фрагменту до зразка та субгеному, від якого він походить, та для проведення фільтрування характеристики для забезпечення того, що тільки послідовності з високими показниками використовували для подальших аналізів. Після цього розроблені покупцем прописи PERL та ручну обробку даних у MICROSOFT EXCEL 2010™ (Microsoft Corporation) використовували для ідентифікації фрагментів, що містять щ послідовність як донорної молекули ДНК, що використовуються для трансфекції, так і локусу ендогенного гена AHAS. Для забезпечення однозначного розрізнення між фрагментами

послідовності, що походять від опосередкованого ZFN HR-направленого редагування гену, та тими, що виникають в результаті наявності залишків (будь-якої) донорної ДНК, що використовується для трансфекції, було задекларовано молекулярне підтвердження редагування гена тільки у тому випадку, коли фрагмент послідовності також містив NHEJ делецію у положенні розриву дволанцюгової ДНК, який було створено при використанні ZFN; тобто фрагмент послідовності продемонстрував підтвердження одержання неправильного HR-направленого відновлення ДНК. Частоту редагування (що виражається у частинах на млн. фрагментів) розраховували як частку фрагментів послідовності, які приписані до субгеному та які демонструють підтвердження для опосередкованого ZFN HR-направленого редагування гену.

З результатів трьох біологічних повторностей, які проводили для кожної конструкції ДНК плазмідного донора, молекулярне підтвердження одержували для збагачення фрагментів послідовності, які демонструють опосередковане ZFN HR-направлене редагування у трьох гомологічних копіях ендогенних генів AHAS у пшениці (Таблиця 5 та Таблиця 6). Переконливий молекулярний доказ був отриманий шляхом додання сайту EcoRI рестрикційної ендонуклеази у положення розриву дволанцюгової ДНК, створеного при використанні ZFN 29732 та 29730 в усіх трьох гомологічних копіях ендогенного гена AHAS як у зразках SEC протопластів, так і у щитках незрілих зиготних зародків пшениці, що були трансфіковані при використанні pDAB109350 та pDAS000131. Частота опосередкованого ZFN HR-направленого редагування гену була найвищою у D-геномі, на який була націлена донорна молекула ДНК. Подібного до цього, переконливе молекулярне підтвердження одержували для введення донорного полінуклеотиду, що містив S653N мутацію в усіх трьох гомологічних копіях ендогенних генів AHAS у зразках щитків незрілих зиготних зародків, що були трансфіковані при використанні pDAB109350 та будь-яким з pDAS000132, pDAS000133 або pDAS000134; переконливе молекулярне підтвердження також спостерігали для зразків SEC протопластів, трансфікованих за допомогою pDAB109350 та pDAS000134. Частота опосередкованого ZFN HR-направленого редагування гена знову була найвищою у субгеномі, до якого була приписана донорна молекула ДНК. Важливо зазначити, що частота редагування у зразках SEC протопластів та щитках незрілих зиготних зародків, трансфікованих при використанні pDAB109350 та pDAS000135, була нижче (приблизно у 10 разів), ніж така, що спостерігалася для зразків, трансфікованих при використанні pDAB109350 та pDAS000134. Цей результат був очікуваним завдяки штрафу, що накладається на ефективність для HR-направленого відновлення ДНК у зв'язку із присутністю фланкуючих мутацій у донорній конструкції pDAS00135.

Таблиця 5

Середнє значення частоти HR-направленого редагування у частинах на мільйон (част. на млн.) у трьох біологічних повторностях для щитків, трансфікованих при використанні конструкцій плазмідної донорної ДНК. "н/з" означає "не застосовується

Донор	Суб-геном націлю-вання	ZFN	Молярне співвідн. донора до ZFN	Частота редагування у субгеномі пшениці	Частота редагування (част. на млн.)
pDAS000131	D	н/з	н/з	A	0
pDAS000131	D	29732-2A-29730	5:1	A	251
pDAS000131	D	29732-2A-29730	10:1	A	46
pDAS000131	D	н/з	н/з	B	0
pDAS000131	D	29732-2A-29730	5:1	B	106
pDAS000131	D	29732-2A-29730	10:1	B	19
pDAS000131	D	н/з	н/з	D	3
pDAS000131	D	29732-2A-29730	5:1	D	2,577
pDAS000131	D	29732-2A-29730	10:1	D	642
pDAS000132	A	н/з	н/з	A	5
pDAS000132	A	29732-2A-29730	5:1	A	2,353
pDAS000132	A	29732-2A-29730	10:1	A	1,800
pDAS000132	A	н/з	н/з	B	0
pDAS000132	A	29732-2A-29730	5:1	B	42
pDAS000132	A	29732-2A-29730	10:1	B	30

Донор	Субгеном націлювання	ZFN	Молярне співвідн. донора до ZFN	Частота редагування у субгеномі пшениці	Частота редагування (част. на млн.)
pDAS000132	A	н/з	н/з	D	0
pDAS000132	A	29732-2A-29730	5:1	D	110
pDAS000132	A	29732-2A-29730	10:1	D	61
pDAS000133	B	н/з	н/з	A	0
pDAS000133	B	29732-2A-29730	5:1	A	230
pDAS000133	B	29732-2A-29730	10:1	A	149
pDAS000133	B	н/з	н/з	B	8
pDAS000133	B	29732-2A-29730	5:1	B	5,528
pDAS000133	B	29732-2A-29730	10:1	B	4,472
pDAS000133	B	н/з	н/з	D	0
pDAS000133	B	29732-2A-29730	5:1	D	0
pDAS000133	B	29732-2A-29730	10:1	D	0
pDAS000134	D	н/з	н/з	A	2
pDAS000134	D	29732-2A-29730	5:1	A	316
pDAS000134	D	29732-2A-29730	10:1	A	959
pDAS000134	D	н/з	н/з	B	1
pDAS000134	D	29732-2A-29730	5:1	B	110
pDAS000134	D	29732-2A-29730	10:1	B	318
pDAS000134	D	н/з	н/з	D	19
pDAS000134	D	29732-2A-29730	5:1	D	4,662
pDAS000134	D	29732-2A-29730	10:1	D	9,043
pDAS000135	D	н/з	н/з	A	0
pDAS000135	D	29732-2A-29730	5:1	A	38
pDAS000135	D	29732-2A-29730	10:1	A	97
pDAS000135	D	н/з	н/з	B	0
pDAS000135	D	29732-2A-29730	5:1	B	14
pDAS000135	D	29732-2A-29730	10:1	B	31
pDAS000135	D	н/з	н/з	D	1
pDAS000135	D	29732-2A-29730	5:1	D	541
pDAS000135	D	29732-2A-29730	10:1	D	1,191

Таблиця 6

Середнє значення частоти HR-направленого редагування у частинах на мільйон (част. на млн.) у трьох біологічних повторностях для SEC протопластів, трансфікованих при використанні конструкцій плазмідної донорної ДНК. “н/з” означає “не застосовується

Донор	Субгеном націлювання	ZFN	Молярне співвідн. донора до ZFN	Частота редагування у субгеномі пшениці	Частота редагування (част. на млн.)
pDAS000131	D	н/з	н/з	A	0
pDAS000131	D	29732-2A-29730	7:1	A	50
pDAS000131	D	н/з	7:1	B	0
pDAS000131	D	29732-2A-29730	7:1	B	0
pDAS000131	D	н/з	7:1	D	4
pDAS000131	D	29732-2A-29730	7:1	D	212

Донор	Субгеном націлювання	ZFN	Молярне співвідн. донора до ZFN	Частота редагування у субгеномі пшениці	Частота редагування (част. на млн.)
pDAS000134	D	н/з	7:1	A	0
pDAS000134	D	29732-2A-29730	7:1	A	0
pDAS000134	D	н/з	7:1	B	0
pDAS000134	D	29732-2A-29730	7:1	B	0
pDAS000134	D	н/з	7:1	D	32
pDAS000134	D	29732-2A-29730	7:1	D	258
pDAS000135	D	н/з	7:1	A	0
pDAS000135	D	29732-2A-29730	7:1	A	0
pDAS000135	D	н/з	7:1	B	0
pDAS000135	D	29732-2A-29730	7:1	B	0
pDAS000135	D	н/з	7:1	D	0
pDAS000135	D	29732-2A-29730	7:1	D	1

Аналіз даних для визначення опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування у гені AHAS

Після одержання даних стосовно коротких фрагментів послідовності у відповідності з Illumina для зразків бібліотеки, одержаних для трансфікованих SEC протопластів та щитків незрілих зиготних зародків пшениці проводили аналізи для ідентифікації молекулярного підтвердження опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування у сайтах-мішенях для ZFN.

Для ідентифікації фрагментів послідовності для молекулярного підтвердження NHEJ-направленого редагування гену короткі фрагменти послідовності спочатку піддавали комп'ютерній обробці, як описано раніше, для віднесення кожного фрагменту до зразка та субгеному, від якого він походить, та для проведення фільтрування характеристики для забезпечення того, що тільки послідовності з високими показниками використовували для подальших аналізів. Після цього розроблені покупцем прописи PERL та ручну обробку даних у MICROSOFT EXCEL 2010™ (Microsoft Corporation) використовували для ідентифікації фрагментів, що містять послідовність як донорної молекули ДНК, що використовувалася для трансфекції, так і локусу ендогенного гена AHAS. Частоту редагування (що виражається у частинах на млн. фрагментів) розраховували як частку приписаних до субгеному фрагментів послідовності, що демонструють підтвердження для опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування гену.

З результатів трьох біологічних повторностей, які проводили для кожної конструкції ДНК плазмідного донора, молекулярне підтвердження одержували для збагачення фрагментів послідовності, які демонструють опосередковане ZFN NHEJ-направлене редагування у трьох гомологічних копіях ендогенних AHAS генів у пшениці (Таблиця 7 та Таблиця 8). Переконливий молекулярний доказ був отриманий для інтеграції лінійної дволанцюгової донорної молекули, що містить 41 п.о. у положенні розриву дволанцюгової ДНК, створеного при використанні ZFN 29732 та 29730 в усіх трьох гомологічних копіях ендогенного гена AHAS як у зразках SEC протопластів, так і у щитках незрілих зиготних зародків пшениці, що були трансфіковані при використанні pDAB109350 та pDAS000152. Подібну ефективність редагування спостерігали у трьох субгеномах пшениці. На противагу до цього, зразки SEC протопластів та щитків незрілих зиготних зародків, трансфікованих при використанні pDAB109350 та pDAS000153, продемонстрували слабке підтвердження опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування гена, головним чином, завдяки обов'язковій вимозі для in planta вивільнення донорної послідовності розміром 41 п.о. із каркасу плазміди. Молекулярне підтвердження заміщення послідовності ендогенного гена AHAS донорою молекулою, що включає 41 п.о., спостерігали як у випадку SEC протопластів, так і у випадку щитків незрілих зиготних зародків, які були трансфіковані при використанні pDAB109350, pDAB109360 та pDAS000149. Проте частота редагування була значно нижчою, ніж та, яку спостерігали для трансфекцій, які здійснювали при використанні pDAB109350 та pDAS000152, головним чином, завдяки вимозі подвійного розщеплення ZFN послідовності ендогенного гена AHAS. Обмежене підтвердження було одержане для заміщення послідовності ендогенного AHAS донорною молекулою, що містить 41 п.о., що є необхідним для in planta вивільнення з каркасу плазміди у зразках SEC

протопластів та щитків незрілих зиготних зародків, що були трансфіковані при використанні pDAB109350, pDAB109360 та pDAS000150.

Таблиця 7

Середнє значення частоти NHEJ редагування у частинах на мільйон (част. на млн.) у трьох біологічних повторностях для щитків, трансфікованих при використанні конструкцій лінійної дволанцюгової донорної ДНК. “н/з” означає “не застосовується

Донор	Субгеном націлювання	ZFN	Молярне співвідн. донора до ZFN	Частота редагування у субгеномі пшениці
pDAS000152	н/з	н/з	A	0
pDAS000152	29732-2A-29730	5:1	A	0
pDAS000152	29732-2A-29730	10:1	A	131
pDAS000152	н/з	н/з	B	0
pDAS000152	29732-2A-29730	5:1	B	0
pDAS000152	29732-2A-29730	10:1	B	47
pDAS000152	н/з	н/з	D	0
pDAS000152	29732-2A-29730	5:1	D	0
pDAS000152	29732-2A-29730	10:1	D	75
pDAS000153	н/з	н/з	A	0
pDAS000153	29732-2A-29730	5:1	A	4
pDAS000153	29732-2A-29730	10:1	A	0
pDAS000153	н/з	н/з	B	0
pDAS000153	29732-2A-29730	5:1	B	0
pDAS000153	29732-2A-29730	10:1	B	0
pDAS000153	н/з	н/з	D	0
pDAS000153	29732-2A-29730	5:1	D	0
pDAS000153	29732-2A-29730	10:1	D	0
pDAS000149	н/з	н/з	A	0
pDAS000149	29732-2A-29730	5:1	A	23
pDAS000149	29732-2A-29730	10:1	A	9
pDAS000149	н/з	н/з	B	0
pDAS000149	29732-2A-29730	5:1	B	7
pDAS000149	29732-2A-29730	10:1	B	3
pDAS000149	н/з	н/з	D	0
pDAS000149	29732-2A-29730	5:1	D	7
pDAS000149	29732-2A-29730	10:1	D	0
pDAS000150	н/з	н/з	A	0
pDAS000150	29732-2A-29730	5:1	A	1
pDAS000150	29732-2A-29730	10:1	A	0
pDAS000150	н/з	н/з	B	0
pDAS000150	29732-2A-29730	5:1	B	0
pDAS000150	29732-2A-29730	10:1	B	0
pDAS000150	н/з	н/з	D	0
pDAS000150	29732-2A-29730	5:1	D	4
pDAS000150	29732-2A-29730	10:1	D	0
pDAS000150	н/з	н/з	A	0

Таблиця 8

Середнє значення частоти NHEJ редагування у частинах на мільйон (част. на млн.) у трьох біологічних повторностях для SEC протопластів, трансфікованих при використанні конструкцій лінійної дволанцюгової донорної ДНК. “н/з” означає “не застосовується

Донор	Субгеном націлювання	ZFN	Молярне співвідн. донора до ZFN	Частота редагування у субгеномі пшениці
pDAS000152	н/з	н/з	A	0
pDAS000152	29732-2A-29730	5:1	A	0
pDAS000152	29732-2A-29730	10:1	A	6717
pDAS000152	29732-2A-29730	20:1	A	5404
pDAS000152	н/з	н/з	B	0
pDAS000152	29732-2A-29730	5:1	B	0
pDAS000152	29732-2A-29730	10:1	B	6306
pDAS000152	29732-2A-29730	20:1	B	4106
pDAS000152	н/з	н/з	D	0
pDAS000152	29732-2A-29730	5:1	D	0
pDAS000152	29732-2A-29730	10:1	D	7911
pDAS000152	29732-2A-29730	20:1	D	4059
pDAS000153	н/з	н/з	A	0
pDAS000153	29732-2A-29730	5:1	A	0
pDAS000153	29732-2A-29730	10:1	A	0
pDAS000153	29732-2A-29730	20:1	A	0
pDAS000153	н/з	н/з	B	0
pDAS000153	29732-2A-29730	5:1	B	0
pDAS000153	29732-2A-29730	10:1	B	0
pDAS000153	29732-2A-29730	20:1	B	0
pDAS000153	н/з	н/з	D	0
pDAS000153	29732-2A-29730	5:1	D	0
pDAS000153	29732-2A-29730	10:1	D	0
pDAS000153	29732-2A-29730	20:1	D	0
pDAS000153	н/з	н/з	A	0
pDAS000153	29732-2A-29730	5:1	A	0
pDAS000149	н/з	н/з	A	0
pDAS000149	29732-2A-29730	5:1	A	0
pDAS000149	29732-2A-29730	10:1	A	0
pDAS000149	29732-2A-29730	20:1	A	344
pDAS000149	н/з	н/з	B	0
pDAS000149	29732-2A-29730	5:1	B	0
pDAS000149	29732-2A-29730	10:1	B	0
pDAS000149	29732-2A-29730	20:1	B	210
pDAS000149	н/з	н/з	D	0
pDAS000149	29732-2A-29730	5:1	D	4
pDAS000149	29732-2A-29730	10:1	D	0
pDAS000149	29732-2A-29730	20:1	D	24
pDAS000150	н/з	н/з	A	0
pDAS000150	29732-2A-29730	5:1	A	0
pDAS000150	29732-2A-29730	10:1	A	0
pDAS000150	29732-2A-29730	20:1	A	0
pDAS000150	н/з	н/з	B	0
pDAS000150	29732-2A-29730	5:1	B	0
pDAS000150	29732-2A-29730	10:1	B	0
pDAS000150	29732-2A-29730	20:1	B	0
pDAS000150	н/з	н/з	D	0

Донор	Субгеном націлювання	ZFN	Молярне співвідн. донора до ZFN	Частота редагування у субгеномі пшениці
pDAS000150	29732-2A-29730	5:1	D	0
pDAS000150	29732-2A-29730	10:1	D	0
pDAS000150	29732-2A-29730	20:1	D	0

Узяті разом ці результати забезпечують переконливий доказ для точного опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування у локусі ендогенного гена AHAS у пшениці. Ці результати показують, що усі три субгеноми можуть бути націленими при використанні одного ZFN та донора. Ці результати ясно демонструють більш високу частоту редагування для лінійної конструкції донорної ДНК у порівнянні із конструкціями плазмідної донорної ДНК. Головним чином, такі результати досягалися завдяки обов'язковій вимозі щодо in planta лінеаризації плазмідних донорних молекул перед тим, як вони будуть брати участь у NHEJ-направленому відновленні ДНК. Ці результати також свідчать про те, що опосередковане специфічністю для субгеному NHEJ-направлене редагування гена поліпшується при використанні розриву дволанцюгової ДНК. ZFN, які конструювали для індукції розривів дволанцюгової ДНК, приводили до опосередкованого специфічністю для субгеному NHEJ-направленого редагування гену, коли доставляються за допомогою донорної ДНК у рослинні клітини Triticum aestivum.

Приклад 5: Розробка системи трансформації для одержання рослин з редагованим AHAS

Локус ендогенного гена AHAS у пшениці вибирали як модельний локус розробки системи трансформації для одержання рослин з точними геномними модифікаціями, індукованими опосередкованим ZFN редагуванням гена. Ендогенний ген AHAS вибирали як модельний локус завдяки його здатності продукувати здатний до селекції фенотип (тобто, толерантність до гербіцидів групи B або гербіцидів на основі інгібітора ALS, таких як імідазолінон або сульфонілсечовина), знання точної інформації щодо послідовності, яка кодує ген, який є специфічним для субгеному та знання специфічних мутацій, що надають толерантнотсі до гербіцидів групи B або гербіцидів на основі інгібітора ALS з характеристики пшениці з хімічно індукованими мутаціями у генах AHAS. S653N мутація, що надає толерантності до гербіцидів класу імідазолінону, була вибрана як ціль для опосередкованого ZFN редагування гену завдяки доступності комерційних сортів пшениці, які несуть S653N мутацію та які можуть використовуватися як позитивні контролі для розробки хімічних систем селекції для збагачення на події, які мають точне редагування.

Молекулярна характеристика Clearfield Janz культивару Triticum aestivum

Clearfield Janz культивар Triticum aestivum, що являє собою комерційний сорт пшениці звичайної, який несе S653N мутацію у D-геномі, був вибраний для використання як позитивний контроль для розробки стратегії хімічної селекції для збагачення на рослин пшениці з "редагованим геном AHAS, які одержують шляхом опосередкованого ZFN редагування гену. Для одержання генетично чистого насінного фонду 48 проростків піддавали скринінгу за допомогою 96 мікросателітних (SSR) маркерів при використанні методики ПЛР Multiplex-Ready (Hayden та ін., (2008) BMC Genomics 9; 80). Проростки з ідентичними SSR гаплотипами використовували для одержання насіння, яке використовували у подальших експериментах.

Для впевненості у тому, що використовувані для одержання насіння рослини несли S653N мутацію, розробляли аналіз ПЛР для ампліфікації ділянки гена AHAS, що несе мутацію у D-геномі пшениці. Специфічна для субгеному ампліфікація була досягнута при використанні ПЛР у режимі вкл./викл. (Yang та ін., (2005) Biochemical and Biophysical Research Communications 328: 265-72) з праймерами AHAS-PS-6DF2 та AHAS-PS-6DR2 (SEQ ID NO: 82 та SEQ ID NO: 83), сконструйованими для позиціонування передостанньої основи (що містить фосфоротіоатний зв'язок) на доповнення до варіації нуклеотидної послідовності, яка відрізняється між гомологічними копіями генів AHAS. Праймери ПЛР конструювали як такі, що містяться між 18 та 27 нуклеотидами та мають температуру плавлення від 60 до 65°C, з оптимальною при 63°C. Ампліфіковані продукти ПЛР очищали при використанні набору QIAQUICK MINIELUTE PCR PURIFICATION KIT™ (Qiagen) та піддавали секвенуванню при використанні прямого способу секвенування за Сенгером. Продукти секвенування очищали при використанні етанолу, ацетату натрію та ЕДТА у відповідності з прописом BIGDYE® v3.1 (Applied Biosystems), та електрофорез здійснювали на ABI3730XL® автоматизованій платформі для проведення капілярного електрофорезу.

Аналіз ампліфікованих послідовностей гена AHAS при використанні SEQUENCHER v3.7™ (GeneCodes, Ann Arbor, MI) виявив сегрегацію для S653N мутації та дозволив провести

ідентифікацію рослин, які були гомозиготними (N653/N653) та гетерозиготними (N653/S653) за S653N мутацією або гомозиготними (S653/S653) за чутливим до гербіциду алелем. Врожай насіння індивідуальних рослин забезпечував джерело насіння, що має різні рівні зиготності щодо S653N мутації у генетичному фоні культивару Clearfield Janz.

Оптимізація умов хімічної селекції на основі Імазамоксу™

Проводили серії експериментів для визначення оптимальних умов селекції для регенерації рослин пшениці з "редагованим" геном AHAS. Ці експерименти базувалися на аналізі базисної толерантності до Імазамоксу™ донорної лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH (S653/S653 генотип) на стадії індукції калусів, регенерації рослин та укорінення встановлених систем трансформації пшениці. Подібні експерименти проводили для визначення базисної толерантності та резистентності генотипів культивару Clearfield Janz, що несуть різні дози S653N мутації; тобто рослин з N653/N653 та S653/S653 генотипами.

Базисну толерантність донорної лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH та базисну толерантність генотипу культивару Clearfield Janz (N653/N653) до Імазамоксу® на стадії індукції калусів визначали так, як описано нижче: щитки незрілих зиготних зародків з кожної лінії пшениці ізолювали так, як описано раніше, та поміщали у чашки Петрі™ діаметром 10 см, що містять CIM середовище, доповнене 0, 50, 100, 200, 300, 400 та 500 нМ Імазамоксу®, відповідно. Двадцять щитків поміщали на кожну чашку Петрі™. Загальну кількість 60 щитків з генотипом кожної донорної лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH та культивару Clearfield Janz піддавали аналізу на відповідь щодо базисної толерантності та базисної резистентності, відповідно, при кожній концентрації Імазамоксу®. Після інкубації при 24°C у темряві протягом 4 тижнів реєстрували кількість утворених соматичних ембріогенних калусів (SEC) при кожній концентрації Імазамоксу®. Результати експерименту показали, що утворення SEC для культивару Bobwhite MPB26RH знижувалося приблизно на 70% при концентрації 100 нМ Імазамоксу®, у порівнянні із необробленими зразками. Утворення калусів для генотипу культивару Clearfield Janz не піддавалося впливу у порівнянні із необробленим контролем при будь-якій дослідженій концентрації Імазамоксу®.

Базисну толерантність донорної лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH до Імазамоксу® на стадії регенерації рослин визначали наступним чином: щитки незрілих зиготних зародків з донорної лінії пшениці ізолювали так, як описано раніше, та поміщали у чашки Петрі™ діаметром 10 см, що містили CIM середовище. Утворення соматичного ембріогенного калусу здійснювали при інкубації при температурі 24°C у темряві протягом 4 тижнів. SEC переносили до чашки Петрі™ діаметром 10 см, що містили DRM середовище з доданням 0, 100, 200, 300, 400, 500 та 1000 нМ Імазамоксу®, відповідно. Двадцять CIM поміщали на кожну чашку Петрі. Загалом піддавали аналізу на базисну толерантність 60 CIM при кожній концентрації Імазамоксу®. Після інкубації протягом 2 тижнів при температурі 24°C при фотоперіоді 16/8 годин (світло/темрява) у ростовій камері реєстрували відповідь регенерації. Результати показали, що регенерація рослин знижувалася приблизно на 80% при концентрації 200 нМ Імазамоксу®, у порівнянні із необробленими зразками.

Базисну толерантність генотипу культивару Clearfield Janz (S653/S653) та бизисну резистентність генотипу культивару Clearfield Janz (N653/N653) до Імазамоксу® на стадії регенерації рослини визначали при використанні модифікованого підходу, враховуючи той факт, що культивар Clearfield Janz мав слабку відповідь регенерації (тобто, слабкий ембріогенез) у тканинній культурі. Насіння для кожного генотипу культивару Clearfield Janz розмножували при використанні асептичного підходу, описаного вище, для одержання протопластів мезофілу пшениці. Вирощені проростки розмножували in vitro шляхом субкультивування на середовищі для розмноження. Після розмноження рослини для кожного генотипу переносили на чашки Петрі діаметром 10 см, що містили середовище для росту рослин (Мурасіге та Скуга + 10 мкМ BA + 0,8% агар) з доданням 0 , 100, 300, 600, 900, 1200, 1500 та 3000 нМ Імазамоксу®, відповідно. Десять рослин переносили у кожну чашку Петрі. Загальну кількість 30 рослин на генотип піддавали аналізу на базисну відповідь при кожній концентрації Імазамоксу®. Після інкубації протягом 3 тижнів при температурі 24°C при фотоперіоді 16/8 годин (світло/темрява) у вегетаційній камері, реєстрували ростову відповідь. Результати показали, що ріст рослин для генотипу культивару Clearfield Janz (S653/S653) був значним чином знижений у середовищі, що містить принаймні 200 нМ Імазамоксу®, у порівнянні із необробленими зразками. Ця відповідь була подібною до тієї, яку спостерігали для генотипу культивару Bobwhite MPB26RH (S653/S653). На противагу до цього, ріст рослин для генотипу культивару Clearfield Janz (N653/N653) піддавався значній супресії у порівнянні із необробленими зразками до тих пір, поки концентрація Імазамоксу® не перевищувала 2000 нМ.

Базисну толерантність донорної лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH до

Імазамоксу® на етапі укорінення рослин визначали так, як описано нижче: щитки незрілих зиготних зародків з донорної лінії пшениці ізолювали так, як описано раніше, та поміщали у чашки Петрі™ діаметром 10 см, що містили CIM середовище. Щитки залишали для отримання соматичного ембріогенного калусу при інкубації при температурі 24°C у темряві протягом 4 тижнів. SEC переносили у чашки Петрі діаметром 10 см, що містили DRM середовище та інкубували протягом 2 тижнів при 24°C в умовах фотоперіоду 16/8 годин (світло/темрява) для проведення процесу регенерації рослин. Регенеровані рослини переносили на чашки Петрі діаметром 10 см, що містили RM середовище з доданням 0, 100, 200, 300, 400, 500 нМ Імазамоксу®, відповідно. Двадцять регенерованих рослин висаджували у кожну чашку Петрі™. Загальну кількість 60 регенерованих рослин піддавали аналізу на відповідь базисної толерантності при кожній концентрації Імазамоксу®. Після інкубації протягом 3 тижнів при температурі 24°C в умовах фотоперіоду 16/8 годин (світло/темрява) у вегетаційній камері реєстрували відповідне утворення коренів. Результати продемонстрували, що утворення коренів було жорстко обмежене при усіх проаналізованих концентраціях Імазамоксу®, у порівнянні із необробленими зразками.

Базисну толерантність генотипу культивару Clearfield Janz (S653/S653) та базисну резистентність генотипу культивару Clearfield Janz (N653/N653) до Імазамоксу® на стадії утворення коренів визначали при використанні модифікованого підходу, оскільки спостерігали слабку відповідну регенерацію рослин культивару Clearfield Janz (тобто, слабкий ембріогенез) у тканинній культурі. Насіння для кожного генотипу культивару Clearfield Janz розмножували при використанні асептичного підходу, описаного вище, для одержання протопластів мезофілу пшениці. Вирощені проростки розмножували in vitro шляхом субкультивування на середовищі для розмноження. Після розмноження рослини для кожного генотипу переносили на чашки Петрі діаметром 10 см, що містили середовище для укорінення рослин (1/2 Мурасіге та Скуга, 0,5 мг/л NAA, 0,8% агар) з доданням 0, 50, 100, 200 та 250 нМ Імазамоксу®, відповідно. Три регенеровані рослини висаджували у кожну чашку Петрі™. Загальну кількість 6 регенерованих рослин на генотип піддавали аналізу на базисну відповідь при кожній концентрації Імазамоксу®. Після інкубації протягом 2 тижнів при температурі 24°C в умовах фотоперіоду 16/8 годин (світло/темрява) у вегетаційній камері реєстрували відповідне утворення коренів.

Результати показали, що утворення коренів для генотипу культивару Clearfield Janz (N653/N653) було обмеженим у порівнянні із необробленими зразками при концентрації Імазамоксу® 250 нМ. Утворення коренів було жорстко обмеженим у генотипу культивару Clearfield Janz (S653/S653) при усіх проаналізованих концентраціях Імазамоксу®, у порівнянні із необробленими зразками.

Конструювання та синтез донорної ДНК для опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування гена AHAS

Два типи молекули донорної ДНК конструювали для того, щоб сприяти точному опосередкованому ZFN NHEJ-направленому редагуванню гена в ендогенних генах AHAS у пшениці. Обидві моделі донора дозволяли проводити введення S653N мутації, що є відомою як така, що забезпечує толерантність до гербіцидів класу імідазолінонів (Li та ін., (2008) Molecular Breeding 22:217-225).

Перша модель базувалася на інтеграції дволанцюгової донорної молекули, що містить 95 п.о., у положенні розриву дволанцюгової ДНК, створеного при використанні розщеплення гомологічної копії ендогенного гена AHAS ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350). Молекула донорної ДНК, pDAS000267 (SEQ ID NO:84 та SEQ ID NO:85), включала дві частини інтеграційного донорного полінуклеотиду. 5' кінець містив послідовність, яка була майже ідентичною ендогенному гену AHAS, що кодується у D-геномі, починаючи із сайту-мішені для розщеплення ZFN та закінчуючись стоп-кодоном AHAS. Шість запланованих мутацій було введено у цю послідовність: дві мутації кодували S653N мутацію (AGC→AAT), а чотири мутації були синонімічними (де мовчазна мутація була введена у донорну послідовність). 3' кінець донорної молекули містив унікальну послідовність, що може використовуватися у діагностичній ПЛР для визначення опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування подій у гені. Донорну молекулу конструювали з виступаючими 5' та 3' кінцями для забезпечення лігування виступаючих кінців, що сприяє опосередкованому ZFN NHEJ-направленому відновленню ДНК.

Друга модель базувалася на заміщенні послідовності ендогенного гена AHAS, що розміщується між парою ZFN сайтів-мішеней, дволанцюговою донорною молекулою, що містить 79 п.о. Зокрема, донор конструювали для заміщення ендогенної послідовності AHAS, що вивільняється з хроматину при подвійному розщепленні гомологічної копії гену AHAS при використанні ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350) та ZFN 30012 та

30018 (що кодуються плазмідою pDAB109360). Донорна молекула, pDAS000268 (SEQ ID NO:86 та SEQ ID NO:87), включала послідовність, яка була майже ідентичною ендогенному гену AHAS, що кодується у D-геномі, починаючи із сайту розщеплення для ZFN 29732 та 29730, та закінчуючи сайтом розщеплення для ZFN 30012 та 30018. Десять вивільнених мутацій вводили у цю послідовність. Шість мутацій були розміщені на 5' кінці донора: дві мутації кодували S653N мутацію (AGC→AAT) та чотири мутації були синонімічними. Чотири мутації були розміщені на 3' кінці донора та були розміщені у некодуючій послідовності. Донорну молекулу конструювали з виступаючими 5' та 3' кінцями для забезпечення лігування виступаючих кінців, що сприяє опосередкованому ZFN NHEJ-направленому відновленню ДНК.

Стандартну фосфорамідатну хімію використовували для штучного синтезу дволанцюгових донорних молекул (Integrated DNA Technologies). Для кожної донорної молекули синтезували пари комплементарних олігомерів одноланцюгової ДНК, кожна з яких мала фосфоротіоатні зв'язки на своїх 5' кінцях для забезпечення захисту від in planta ендонуклеазної деградації. Олігомери одноланцюгової ДНК очищали при використанні високоефективної рідинної хроматографії для збагачення на молекули повної довжини, та очищали від залишків етапів хімічного синтезу при використанні Na^+ обміну. Дволанцюгова молекула донора була сформована шляхом відпалювання еквімолярних кількостей двох комплементарних одноланцюгових ДНК олігомерів при використанні стандартних способів, які є добре відомими фахівцям у даній галузі техніки. Перед доставкою у Triticum aestivum дволанцюгові молекули ДНК розводили до необхідної концентрації у стерильній воді.

Конструювання та одержання бінарного вектора, що кодує AHAS (S653N)

Стандартні способи клонування використовували у конструюванні бінарного вектора pDAS000143 (SEQ ID: 88) (Фігура 10). Експресійна касета гена AHAS (S653N) складалася з промотора, 5' нетрансльованої ділянки та інтрона з гена убіквітину (Ubi), одержаного із Zea mays (Toki та ін., (1992) Plant Physiology 100; 1503-07), за якими розміщувалася кодуюча послідовність (1935 п.о.) гена AHAS з T. aestivum з парами основ 1880 та 1181, мутованими з CG на AT, для того, щоб провести індукцію амінокислотної заміни серину (S) на аспарагін (N) у положенні амінокислотного залишка 653. Експресійна касета AHAS включала 3' нетрансльовану ділянку (UTR) гена нопалінсинтази (nos) з A. tumefaciens pTi15955 (Fraley та ін. ,(1983) Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 80(15); 4803-4807). Касета для селекції включала промотор, 5' нетрансльовану ділянку та нітрон з гена актину 1 (Act1), одержаний з Oryza sativa (McElroy та ін., (1990) The Plant Cell 2(2); 163-171), за якими розміщувався синтетичний, оптимізований для рослин варіант гена фосфінотрицинацетил трансферази (PAT), ізольований з Streptomyces viridochromogenes, що кодує білок, який надає резистентності до інгібіторів глутамінсинтази, які включають фосфінотрицин, глюфозинат та біалафос (Wohlleben та ін., (1988) Gene 70(1); 25-37). Ця касета закінчувалася 3' нетрансльованою ділянкою з гена 35S вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV) (Chenault та ін., (1993) Plant Physiology 101 (4); 1395-1396).

Селективну касету синтезували за допомогою комерційного постачальника послуг щодо синтезу генів (GeneArt, Life Technologies) та клонували у бінарний вектор Gateway, що дозволяє здійснювати стикування RfA Gateway касети, яка розміщується між геном убіквітину (Ubi) із Zea mays та 3' нетрансльованою ділянкою (UTR), що включає термінатор транскрипції та сайт поліаденілування гена нопалінсинтази (nos) A. tumefaciens pTi15955. Кодуючу послідовність AHAS(S653N) піддавали ампліфікації при використанні фланкуючих attB сайтів та субклонували у pDONR221. Одержаний ENTRY клон використовували у реакції LR CLONASE II™ (Invitrogen, Life Technologies) із застосуванням Gateway бінарного вектора, що кодує експресійну касету фосфінотрицинацетилтрансферази (PAT). Колонії клітин E. coli, трансформовані при використанні усіх продуктів реакції лігування, спочатку піддавали скринінгу шляхом рестрикційного перетравлювання miniprep ДНК. Рестрикційні ендонуклеази одержували від New England BioLabs та Promega. Одержання плазмід здійснювали при використанні набору QIAPREP SPIN MINIPREP KIT™ або системи PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM™ (Promega Corporation, WI) у відповідності з інструкціями виробника. Плазмідну ДНК відібраних клонів піддавали секвенуванню при використанні ABI секвенування за Сенгером та BIG DYE TERMINATOR v3.1™ пропису циклу секвенування (Applied Biosystems, Life Technologies). Дані стосовно послідовності поєднували та піддавали аналізу при використанні програмного забезпечення SEQUENCHER™ (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

Система біолістичної трансформації для одержання рослин пшениці з редагованим AHAS

Приблизно 23000 щитків незрілих зиготних зародків пшениці донорної лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH готували для трансфекції при використанні біолістично опосередкованої доставки ДНК так, як було описано раніше. Вкриті ДНК частинки золота

одержували так, як описувалося вище при використанні наступних композицій. Для здійснення трансфекції при використанні pDAS000267 донорну ДНК змішували у молярному співвідношенні 5:1 з плазмідною ДНК для pDAB109350 (що кодує ZFN 29732 та 29730). Для здійснення трансфекції при використанні pDAS000268 донорну ДНК змішували у молярному співвідношенні 10:1:1 з плазмідною ДНК для pDAB109350 (що кодує ZFN 29732 та 29730) та pDAB109360 (що кодує ZFN 30012 та 30018). Трансфекцію, що здійснюється при використанні pDAS000143, проводили із застосуванням частинок золота, які були покриті тільки плазмідною ДНК для pDAS000143.

Біолістично опосередковані трансфекції здійснювали так, як описано раніше. Загальну кількість 15620 щитків піддавали бомбардуванню при використанні частинок золота, вкритих ДНК, що містить pDAS000267. При цьому загальну кількість 7310 щитків піддавали бомбардуванню при використанні частинок золота, вкритих ДНК, що містить pDAS000268, загальну кількість 2120 щитків піддавали бомбардуванню при використанні частинок золота, вкритих pDAS000143. Після проведення бомбардування трансфіковані щитки інкубували при температурі 26°C у темряві протягом 16 годин перед перенесенням на середовище для індукції калусів.

Чотири різні стратегії селекції на основі Імазамоксу® використовували для збагачення на регенеровані рослини пшениці, що мають S653N мутацію, точно інтегровану в одну або більше гомологічних копій ендогенного гена AHAS шляхом опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування гена. Чотири стратегії селекції є описаними у Таблиці 9. Для кожної стратегії щитки культивували у темряві на середовищі для індукції калусів при температурі 24°C протягом 2 тижнів. Одержані калуси один раз піддавали субкультивуванню на свіжому середовищі для індукції калусів та витримували за тих самих умов протягом додаткових двох тижнів. Соматичний ембріогенний калус (SEC) переносили на середовище для регенерації рослин та піддавали культивуванню протягом 2 тижнів при 24°C в умовах фотоперіоду 16/8 годин (світло/темрява) у вегетаційній камері. Регенеровані проростки переносили на середовище для укорінення та культивували за тих самих умов протягом 2-3 тижнів. Для підвищення жорсткості селекції регенерованих рослин, що мають S653N мутацію, коріння регенерованих рослин видаляли та рослини знову піддавали субкультивуванню на середовищі для укорінення за тих самих умов. Укорінені повторно проростки переносили у ґрунту та вирощували в умовах вегетаційного оранжереї. T_1 насіння збирали від індивідуальних рослин, після чого спаковували індивідуальні колоски для запобігання схрещування.

Експлантати щитків, які піддавали бомбардуванню при використанні частинок золота, вкритих pDAS000143, використовували для моніторингу жорсткості селекції при застосуванні чотирьох стратегій хімічної селекції для регенерації рослин пшениці, які несуть S653N мутацію AHAS. Рослини, трансформовані за допомогою pDAS000143, регенерували при використанні процесу, описаного вище.

Таблиця 9

Стратегії хімічної селекції, що використовуються для регенерації рослин пшениці, які мають S653N мутацію, точно інтегровану в одну або більше гомологічних копій ендогенного гена AHAS шляхом опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування гену
(IMI = Імазамокс™)

Етап регенерації рослин	Стратегія 1	Стратегія 2	Стратегія 3	Стратегія 4
Індукція калусів (CIM)	150 нМ IMI	250 нМ IMI	150 нМ IMI	250 нМ IMI
Регенерація рослини (DRM)	150 нМ IMI	0 нМ IMI	250 нМ IMI	250 нМ IMI
Укорінення (RM)	200 нМ IMI	200 нМ IMI	200 нМ IMI	200 нМ IMI

Загалом було отримано 14 рослин пшениці, путативно редагованих при використанні опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування AHAS в результаті трансфекції 22930 щитків незрілих зиготних зародків з донорної лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH. Путативно редаговані рослини були одержані з путативно редагованих рослин, одержаних в результаті чотирьох стратегій селекції для щитків, які піддавали бомбардуванню при використанні частинок золота, вкритих ДНК, що містить pDAS000267. Були одержані дві путативно редаговані рослини в результаті другої стратегії селекції для щитків, які піддавали бомбардуванню при використанні частинок золота, вкритих ДНК, що містить pDAS000268. Загалом 129 путативно трансформованих рослин пшениці, які несуть принаймні одну випадковим чином інтегровану копію AHAS (S653N) донорного полінуклеотиду, було отримано в

результаті застосування чотирьох стратегій хімічної селекції.

Приклад 6: Молекулярна характеристика редагованих рослин пшениці

Рослини пшениці, одержані в результаті бомбардування при використанні донорного полінуклеотиду, який кодує S653N мутацію, були отримані та молекулярно охарактеризовані для ідентифікації субгеномів пшениці, що включають інтеграцію S653N мутації, що виникає в результаті інтеграції донора у сайт розщеплення дволанцюгової геномної ДНК. Перша серія експериментів завершувалася при використанні DAS000143, а друга серія експериментів завершувалася при використанні pDAS000267 та pDAS000268. Індивідуальні рослини пшениці одержували з обох серій експериментів та піддавали аналізу при використанні молекулярного способу для ідентифікації рослин, які містять інтегровану копію AHAS донорного полінуклеотиду, який кодує S653N мутацію.

Аналіз гідролізу зонда (аналогічний аналізу на основі TAQMAN®) для кількісного ПЛР аналізу використовували для підтвердження того факту, що регенеровані рослини пшениці, які піддавали бомбардуванню при використанні pDAS000143, мали принаймні одну довільним чином інтегровану копію AHAS донорного полінуклеотиду, що кодує S653N мутацію. Підтвердження при використанні аналізу послідовності за Сенгером показало, що рослини пшениці, регенеровані з досліду, який здійснювався при бомбардуванні при використанні pDAS000267 та pDAS000268, включав S653N донорний полінуклеотид у принаймні одній гомологічній копії гена AHAS у положенні, що передбачається для опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування гена.

Ізоляція геномної ДНК з регенерованих рослин пшениці

Геномну ДНК екстрагували із замороженої висушування тканини листя, яку збирали від кожної регенерованої рослини пшениці. Свіжо зібрану тканину листя швидко заморожували у рідкому азоті та висушували заморожуванням протягом 24 годин у LABCONCO FREEZONE 4.5® (Labconco, Kansas City, MO) при температурі -40°C та тиску 133 x 10^{-3} мбар. Ліофілізований матеріал піддавали екстракції ДНК при використанні набору DNEASY® PLANT DNA EXTRACTION MINI KIT™ (Qiagen) у відповідності з інструкціями виробника.

ПЛР аналіз для підтвердження випадкової інтеграції AHAS донорного полінуклеотиду, що кодує S653N мутацію

Для підтвердження того, що регенеровані рослини пшениці, одержані в результаті бомбардування, яке проводили при використанні pDAS000143, несли принаймні одну довільним чином інтегровану копію AHAS донорного полінуклеотиду, що кодує S653N мутацію, дуплексний гідроліз зонда для кількісного ПЛР аналізу (аналогічний TAQMAN®) використовували для ампліфікації одиничної копії ендогенного гена, пуроіндоліну-b (Pinb), з D геному гексаплоїдної пшениці (Gautier та ін., (2000) Plant Science 153, 81–91; SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90 та SEQ ID NO: 91 для прямого та зворотного праймерів та послідовності зонда, відповідно) та ділянки промотора актину (Act1), що є присутньою у pDAS000143 (SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93 та SEQ ID NO: 94 для прямого та зворотного праймерів та послідовності зонда, відповідно). Аналізи гідролізу зонда кількісної ПЛР проводили на 24 довільним чином вибраних рослинах пшениці, які були регенеровані в результаті здійснення кожної з чотирьох стратегій хімічної селекції. Оцінку на присутність та оцінене число копій pDAS00143 здійснювали у відповідності зі способом, який є описаним у Livak та Schmittgen (2001) Methods 25(4):402-8.

З цих результаті було одержано підтвердження інтеграції принаймні однієї копії AHAS донорного полінуклеотиду, що кодує S653N мутацію у геномі кожної проаналізованої рослини пшениці. Ці результати свідчать про те, що чотири стратегії хімічної селекції забезпечували проведення жорсткої селекції на експресію S653N мутації у регенерованих рослинах пшениці.

ПЛР аналіз геномної ДНК для опосередкованого ZFN редагування AHAS

Для характеристики субгеномної локалізації та результатів опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування гену у регенерованих рослинах пшениці, використовували ПЛР з праймерами AHAS_3F1 та AHAS_3R1 (SEQ ID NO:95 та SEQ ID NO:96) для ампліфікації ділянки з гомологічної копії генів AHAS. Одержані продукти ПЛР клонували у плазмідний вектор та піддавали секвенуванню за Сенгером при використанні BIGDYE® v3.1 способу (Applied Biosystems) на ABI3730XL® автоматизованій платформі для проведення капілярного електрофорезу. Секвенування за Сенгером до 120 незалежних плазмідних клонів здійснювали для забезпечення того, щоб кожний алель гомолога ендогенного AHAS був секвенований. Аналіз послідовності здійснювали при використанні SEQUENCHER SOFTWARE™ для одержання консенсусної послідовності для кожного алеля трьох гомологічних копій гена AHAS у кожній регенерованій рослині пшениці та для визначення субгеномного походження та послідовності для кожного редагованого алеля.

Цими результатами було продемонстровано вичерпне підтвердження для точного

опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування гена у локусі ендогенного AHAS для 11 з 12 регенерованих рослини пшениці, що були трансформовані при використанні pDAB109350 та pDAS000267 (Таблиця 10), та обох регенерованих рослин пшениці, які були трансформовані при використанні pDAB109350, pDAB109360 та pDAS000268 (Таблиця 11). Спостерігали рослини з діапазоном результатів редагування, включаючи: (1) незалежні події з точним редагуванням алеля, специфічного для субгеному; (2) події з одним точним редагування в A геномі, B геномі та D геномі; (3) події з одночасним редагуванням у множинних субгеномах; та (4) події, що демонструють редагування гемізиготного, гомозиготного алеля, специфічного для субгенома. Спочатку було розкрито спосіб, який може використовуватися для мутації генного локусу у межах усіх трьох геномів рослини пшениці. Були представлені рослини пшениці, що включають інтегрований AHAS донорний полінуклеотид, який кодує S653N мутацію; інтеграція полінуклеотидної послідовності забезпечувала толерантність до гербіцидів класу імідазолінонів. Використання опосередкованого ZFN редагування геному в локусі ендогенного гена у пшениці дозволяє пздійснювати введення агрономічних властивостей (шляхом мутації) за відсутності витратних за часом методів селекції пшениці, які вимагають зворотного схрещування та етапів інтрогресії, що можуть збільшувати час, який є необхідним для інтрогресії ознаки в усі три субгенома. Консенсусні послідовності Сенгера для алелів, що є присутніми у кожному субгеномі для рослин пшениці, які піддавалися редагуванню, забезпечувалися послідовностями SEQ ID NO: 97-180, що представлені у Таблицях 10 та 11.

Таблиця 10

Результати опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування AHAS для рослин пшениці, трансформованих при використанні pDAB109350 та pDAS000267

		A-геном		B-геном		D-геном		
		Алель 1	Алель 2	Алель 1	Алель 2	Алель 1	Алель 2	SEQ ID NO:
Рослина № 1	Стан	PE	NHEJ	IE	UE	IE	UE	97-102
	Номери клонів[1]	13	20	12	19	14	22	
Рослина № 2	Стан	NHEJ	UE	UE	н/в	IE	UE	103-108
	Номери клонів[1]	9	3	16	0	75	17	
Рослина № 3	Стан	PE	UE	UE	н/в	UE	н/в	109-114
	Номери клонів[1]	7	11	29	0	35	0	
Рослина № 4	Стан	PE	UE	IE	UE	PE	IE	115-120
	Номери клонів[1]	6	11	44	30	6	11	
Рослина № 5	Стан	PE	UE	NHEJ	UE	UE	н/в	121-126
	Номери клонів[1]	10	9	15	26	21	0	
Рослина № 6	Стан	UE	н/в	PE	UE	UE	н/в	127-132
	Номери клонів[1]	22	0	11	18	43	0	
Рослина № 7	Стан	PE	UE	UE	н/в	UE	н/в	133-138
	Номери клонів[1]	5	12	26	0	22	0	
Рослина № 8	Стан	UE	н/в	UE	н/в	UE	н/в	139-144
	Номери клонів[1]	32	0	40	0	26	0	
Рослина № 9	Стан	PE	н/в	IE	UE	UE	н/в	145-150
	Номери клонів[1]	24	0	13	21	33	0	

		A-геном		B-геном		D-геном		
		Алель 1	Алель 2	Алель 1	Алель 2	Алель 1	Алель 2	SEQ ID NO:
Рослина № 10	Стан	PE	UE	UE	н/в	UE	н/в	151-156
	Номери клонів[1]	10	19	37	0	29	0	
Рослина № 11	Стан	UE	н/в	UE	н/в	PE	UE	157-162
	Номери клонів[1]	35	0	37	0	15	11	
Рослина № 12	Стан	UE	н/в	UE	н/в	IE	NHEJ	163-168
	Номери клонів[1]	34	0	40	0	14	8	

[1]Кількість незалежних секвенованих плазмідних клонів.
PE = повне редагування; тобто опосередковане ZFN NHEJ-направлене редагування геному, що виконане з передбаченим результатом.
IE = неповне редагування (редагування з дефектами); тобто, опосередковане ZFN NHEJ-направлене редагування геному, що виконане з непередбаченим результатом.
UE = нередагований алель; тобто, алель, що має послідовність дикого типу.
н/в = не визначали; тобто було секвеновано достатню кількість незалежних плазмідних клонів для того, щоб зробити висновок, що альтернативний алель не був присутній і що локус був гомозиготним для одиничного алеля.
NHEJ = сполучення негомологічних кінців; тобто підтвердження результату відновлення ДНК за допомогою сполучення негомологічних кінців, що не приводить до інтеграції донорної молекули у сайті розщеплення ZFN.

Таблиця 11

Результати опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування AHAS для рослин пшениці, трансформованих при використанні pDAB109350, pDAB109360 та pDAS000268.

		A-геном		B-геном		D-геном		
		Алель 1	Алель 2	Алель 1	Алель 2	Алель 1	Алель 2	SEQ ID NO:
Рослина № 12a	Стан	IE	UE	UE	н/в	IE	н/в	169-174
	Номери клонів[1]	5	14	53	0	1	24	
Рослина № 13a	Стан	IE	UE	UE	н/в	UE	н/в	175-180
	Номери клонів[1]	10	12	49	0	18	0	

[1]Кількість незалежних секвенованих плазмідних клонів
IE = неповне редагування (редагування з дефектами); тобто, опосередковане ZFN NHEJ-направлене редагування геному, що виконане з непередбаченим результатом.
UE = нередагований алель; тобто, алель, що має послідовність дикого типу.
н/в = не визначали; тобто було секвеновано достатню кількість незалежних плазмідних клонів для того, щоб зробити висновок, що альтернативний алель не був присутній і що локус був гомозиготним для одиничного алеля.

Приклад 7: Конструювання зв'язувальних доменів "цинкових пальців", специфічних для ділянки в генах AHAS, що кодують P197 амінокислотний залишок

Білки "цинкових пальців", направлені проти послідовності ДНК гомологічних копій генів AHAS, конструювали так, як було описано раніше (див. також Приклад 2). Приклади спіралі впізнання послідовностей-мішеней є представленими у Таблиці 12 (конструкції ділянок спіралей впізнання) та Таблиці 13 (сайти-мішені). У Таблиці 13 нуклеотиди у сайті-мішені, що контактують зі спіралями впізнання ZFP, є позначеними великими літерами; нуклеотиди, які є такими, що не контактують зі спіралями впізнання, позначені маленькими літерами. Сайти-мішені нуклеази "цинкових пальців" (ZFN) є приведеними вище (від 2 до 510 нуклеотидів, представлених вище) ділянки у гені AHAS, що кодує амінокислотний залишок проліну 197 (P197).

Таблиця 12

Конструкції "цинкових пальців" AHAS (н/з означає “не застосовується”)

ZFP#	F1	F2	F3	F4	F5	F6
34456	SEQ ID NO:227 RSADLTR	SEQ ID NO:182 RSDDLTR	SEQ ID NO:182 RSDDLTR	SEQ ID NO:236 RSDALTQ	SEQ ID NO:237 ERGTLAR	SEQ ID NO:182 RSDDLTR
34457	SEQ ID NO:184 QSGDLTR	SEQ ID NO:238 DTGARLK	SEQ ID NO:182 RSDDLTR	SEQ ID NO:239 HRRSRDQ	SEQ ID NO:240 DRSYRNT	н/з
34470	SEQ ID NO:241 RSADLSR	SEQ ID NO:242 RSDHLSA	SEQ ID NO:243 QSSDLRR	SEQ ID NO:233 DRSNLSR	SEQ ID NO:244 RSDDRKT	н/з
34471	SEQ ID NO:184 QSGDLTR	SEQ ID NO:245 RRADRAK	SEQ ID NO:182 RSDDLTR	SEQ ID NO:246 TSSDRKK	SEQ ID NO:227 RSADLTR	SEQ ID NO:247 RNDDRKK
34472	SEQ ID NO:227 RSADLTR	SEQ ID NO:198 DRSNLTR	SEQ ID NO:237 ERGTLAR	SEQ ID NO:182 RSDDLTR	SEQ ID NO:218 DRSDLSR	SEQ ID NO:248 DSSTRRR
34473	SEQ ID NO:219 RSDHLSE	SEQ ID NO:249 HSRTRTK	SEQ ID NO:210 RSDTLSE	SEQ ID NO:250 NNRDRTK	SEQ ID NO:237 ERGTLAR	SEQ ID NO:224 DRSALAR
34474	SEQ ID NO:237 ERGTLAR	SEQ ID NO:182 RSDDLTR	SEQ ID NO:218 DRSDLSR	SEQ ID NO:248 DSSTRRR	SEQ ID NO:198 DRSNLTR	н/з
34475	SEQ ID NO:249 RSDHLSR	SEQ ID NO:73 QQWDRKQ	SEQ ID NO:201 DRSHLTR	SEQ ID NO:216 DSSDRKK	SEQ ID NO:233 DRSNLSR	SEQ ID NO:251 VSSNLTS
34476	SEQ ID NO:218 DRSDLSR	SEQ ID NO:248 DSSTRRR	SEQ ID NO:233 DRSNLSR	SEQ ID NO:184 QSGDLTR	SEQ ID NO:198 DRSNLTR	н/з
34477	SEQ ID NO:237 ERGTLAR	SEQ ID NO:249 RSDHLSR	SEQ ID NO:252 RSDALSV	SEQ ID NO:253 DSSHRTR	SEQ ID NO:216 DSSDRKK	н/з
34478	SEQ ID NO:254 RSDNLTR	SEQ ID NO:255 RSDNLAR	SEQ ID NO:224 DRSALAR	SEQ ID NO:256 DRSHLSR	SEQ ID NO:205 TSGNLTR	н/з
34479	SEQ ID NO:252 RSDALSV	SEQ ID NO:253 DSSHRTR	SEQ ID NO:203 RSDNLSE	SEQ ID NO:254 ARTGLRQ	SEQ ID NO:237 ERGTLAR	SEQ ID NO:224 DRSALAR
34480	SEQ ID NO:255 RSDNLAR	SEQ ID NO:224 DRSALAR	SEQ ID NO:256 DRSHLSR	SEQ ID NO:205 TSGNLTR	SEQ ID NO:249 RSDHLSR	SEQ ID NO:257 TSSNRKT
34481	SEQ ID NO:224 DRSALAR	SEQ ID NO:252 RSDALSV	SEQ ID NO:253 DSSHRTR	SEQ ID NO:203 RSDNLSE	SEQ ID NO:254 ARTGLRQ	н/з
34482	SEQ ID NO:258 RSDDLSK	SEQ ID NO:254 RSDNLTR	SEQ ID NO:221 RSDSLSV	SEQ ID NO:259 RSAHLSR	SEQ ID NO:260 RSDALST	SEQ ID NO:261 DRSTRTK
34483	SEQ ID NO:216 DSSDRKK	SEQ ID NO:259 RSAHLSR	SEQ ID NO:218 DRSDLSR	SEQ ID NO:219 RSDHLSE	SEQ ID NO:262 TSSDRTK	н/з

Таблиця 13

Сайти-мішені "цинкових пальців" AHAS

pDAB#	Приблизний сайт розщеплення по відношенню до Pro-197 AHAS	ZFP # та сайт зв'язування (5'→3')	SEQ ID NO:
pDAB111850 (34456-2A-34457)	499 п.о. вище	34456: cnGCGGCCATGGCGGCGGCGagggtttg	263
		34457: acCTCcCCCGCCGTCGCAttctcnggcg	264
pDAB111855 (34470-2A-34471)	109 п.о. вище	34470: ggCCGGACGCGCGGGCGtanccggacgc	265
		34471: cgTCGGCGTCTGCGTCGCCAcctccggc	266
pDAB111856 (34472-2A-34473)	99 п.о. вище	34472: acGCCGACGCGGCCgGACGCGcgggcgt	267
		34473: gcGTCGCCaCCTCCGGCCCGGgggccac	268
pDAB111857 (34474-2A-34475)	96 п.о. вище	34474: caGACGCCGACGCGGCCggacgcgcggg	269
		34475: gtCGCCACcTCCGGCCCGGGGgccacca	270
pDAB111858 (34476-2A-34477)	90 п.о. вище	34476: gcGACGCAGACGCCGACgcggccggacg	271
		34477: ccTCCGGCCCGGGGGCCaccaacctcgt	272
pDAB111859 (34478-2A-34479)	24 п.о. вище	34478: ggGATGGAGTCGAGGAGngcgtcngcga	273
		34479: tgGTCGCCATCACGGGCCAGgtcccccg	274
pDAB111860 (34480-2A-34481)	18 п.о. вище	34480: acCATGGGGATGGAGTCGAGgagngcgt	275
		34481: ccATCACGGGCCAGGTCccccgccgcat	276
pDAB111861 (34482-2A-34483)	16 п.о. вище	34482: cgACCATGGGGATGGAGTCGaggagngc	277
		34483: caTCACGGGCCAGGTCCcccgccgcatg	278

Конструкції "цинкових пальців" AHAS вводили в експресійні вектори "цинкових пальців" та перевіряли на активність розщеплення при використанні системи дріжджів, що розмножуються брунькуванням, як описується у Прикладі 2. Серед множини ZFN, які були сконструйовані, одержані та проаналізовані на зв'язування з путативними геномними полінуклеотидними сайтами-мішенями AHAS, було ідентифіковано 14 ZFN як такі, що мають in vivo високі рівні активності, та вони були відібрані для подальших експериментів. Усі 14 ZFN конструювали для зв'язування з трьома гомологічними AHAS та вони були охарактеризовані як такі, що є здатними до ефективного зв'язування та розщеплення унікальних геномних полінуклеотидних сайтів-мішеней AHAS in planta.

Приклад 8: Оцінка розщеплення нуклеазою "цинкових пальців" генів AHAS при використанні транзієнтних аналізів

Одержання ZFN конструкції

Плазмідні вектори, що містять експресійні конструкції ZFN, перевіряли на розщеплювальну активність при використанні системи дріжджів (як описується у Прикладі 7), конструювали та заповнювали так, як описано раніше у Прикладі 3. Одержані 14 плазмідних конструкцій: pDAB111850 (ZFNs 34456-2A-34457), pDAB111851 (ZFNs 34458-2A-34459), pDAB111852 (ZFNs 34460-2A-34461), pDAB111853 (ZFNs 34462-2A-34463), pDAB111854 (ZFNs 34464-2A-34465), pDAB111855 (ZFNs 34470-2A-34471), pDAB111856 (ZFNs 34472-2A-34473), pDAB111857 (ZFNs

34474-2A-34475), pDAB111858 (ZFNs 34476-2A-34477), pDAB111859 (ZFNs 34478-2A-34479), pDAB111860 (ZFNs 34480-2A-34481), pDAB111861 (ZFNs 34482-2A-34483), pDAB111862 (ZFNs 34484-2A-34485) та pDAB111863 (ZFNs 34486-2A-34487) підтверджували при використанні перетравлювання рестрикційними ферментами та при використанні ДНК секвенування.

Одержання ДНК з конструкцій ZFN для трансфекції

Перед доставкою у протопласти Triticum aestivum плазмідну ДНК для кожної ZFN конструкції одержували з культур E. coli при використанні системи PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM® (Promega Corporation, Madison, WI) або набору PLASMID MAXI KIT® (Qiagen, Valencia, CA) у відповідності з інструкціями постачальників.

Ізоляція та трансфекція протопластів мезофілу пшениці

Протопласти мезофілу з донорної лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH одержували та піддавали трансфекції при використанні опосередкованої поліетиленгліколем (ПЕГ) доставки ДНК так, як було описано раніше у Прикладі 3.

ПЛР аналіз геномної ДНК протопластів для ZFN послідовності розщеплення

Геномну ДНК ізолювали з трансфікованих протопластів та використовували для ПЛР аналізів для оцінки ефективності розщеплення та специфічності для сайту-мішені ZFN, сконструйованих до ділянки гена AHAS, що кодує P197, як описано раніше у Прикладі 3. П'ять наборів праймерів ПЛР, які містять фосфоротіоатний зв'язок, що позначається зірочкою [*], використовували для ампліфікації локусів сайтів-мішеней для ZFN (Таблиця 14). Кожний набір праймерів конструювали у відповідності з критеріями, що були раніше описані у Прикладі 3.

Таблиця 14

Послідовності праймерів, що використовуються для оцінки ефективності ZFN розщеплення AHAS та специфічності для сайту-мішені.

Назва праймера	Набір праймерів	Послідовність праймера (5'→3')	SEQ ID NO:
AHAS-P197ZFN.F2	Набір 1	a*cactctttccctacacgacgctcttccgatctTCCCCAATTCCAACCCTCT*C	279
AHAS-P197ZFN.R1	Набір 1	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctCGTCAGCGCCTGGTGGATC*T	280
AHAS-P197ZFN.F5	Набір 2	a*cactctttccctacacgacgctcttccgatctGCCCGTCCGAGCCCCGCA*A	281
AHAS-P197ZFN.R1	Набір 2	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctCGTCAGCGCCTGGTGGATC*T	282
AHAS-P197ZFN.F7	Набір 3	a*cactctttccctacacgacgctcttccgatctGCGCTCGCCCGTCATCA*C	283
AHAS-P197ZFN.R5	Набір 3	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctATGGGGATGGAGTCGAGGA*G	284
AHAS-P197ZFN.F9	Набір 4	a*cactctttccctacacgacgctcttccgatctCTTCCGCCACGAGCAGG*G	285
AHAS-P197ZFN.R5	Набір 4	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctATGGGGATGGAGTCGAGGA*G	286
AHAS-P197ZFN.F11	Набір 5	a*cactctttccctacacgacgctcttccgatctTCGTCTCCGCGCTCGCTG*A	287
AHAS-P197ZFN.R6	Набір 5	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctTCCACTATGGGCGTCTCCT*G	288

Аналіз даних для визначення NHEJ у сайті-мішені ZFN

Після одержання даних щодо коротких фрагментів послідовності у відповідності з Illumina для бібліотек зразків, одержаних для бібліотек трансфікованих протопластів мезофілу, здійснювали біоінформаційний аналіз (як описано раніше у Прикладі 3) для ідентифікації делетованих нуклеотидів у сайтах-мішенях для ZFN. Такі делеції є відомими як індикатори для in planta активності ZFN, що є результатом відновлення ДНК при поєднанні негомологічних кінців (NHEJ).

Використовували два підходи для оцінки ефективності та специфічності розщеплення ZFN, які піддавали аналізу. Ефективність розщеплення виражали (у частинах на млн. фрагментів) як співвідношення послідовностей, приписаних до субгеному, що містять NHEJ делецію у сайті-

мішені для ZFN (Таблиця 15). Порядок ранжирування ZFN за їх ефективністю, яку спостерігали, використовували для ідентифікації ZFN з найкращою ефективністю розщеплення для цільової ділянки генів AHAS специфічним для субгеному чином. Усі проаналізовані ZFN продемонстрували NHEJ розподіли розміру делеції, послідовні із тими, на які очікували для in planta активності ZFN. Специфічність розщеплення виражали як співвідношення ефективностей розщеплення, які спостерігали у трьох субгеномах.

Таблиця 15

Ефективність розщеплення для ZFN (виражена як кількість NHEJ подій на млн. фрагментів) та специфічність для сайту-мішені.

ZFN	A-геном	B-геном	D-геном
pDAB111850 (34456-2A-34457)	12,567	1,716	10,399
pDAB111851 (34458-2A-34459)	2,088	995	874
pDAB111852 (34460-2A-34461)	2	2	3
pDAB111853 (34462-2A-34463)	3	0	3
pDAB111854 (34464-2A-34465)	47	92	308
pDAB111855 (34470-2A-34471)	177,866	156,139	134,694
pDAB111856 (34472-2A-34473)	119,857	100,300	87,770
pDAB111857 (34474-2A-34475)	248,115	251,142	202,711
pDAB111858 (34476-2A-34477)	48,339	56,001	44,459
pDAB111859 (34478-2A-34479)	3,069	2,731	3,069
pDAB111860 (34480-2A-34481)	11,790	11,946	11,790
pDAB111861 (34482-2A-34483)	28,719	33,888	28,719
pDAB111862 (34484-2A-34485)	216	111	216
pDAB111863 (34486-2A-34487)	54	28	54

З цих результатів вибирали ZFN, що кодуються плазмідами pDAB111855 (34470-2A-34471), pDAB111856 (34472-2A-34473) та pDAB111857 (34474-2A-34475), для in planta націлювання у подальших експериментах, беручи до уваги їх характеристики значущої активності розщеплення геномної ДНК у кожному з трьох субгеномів пшениці.

Приклад 9: Штучне схрещування та молекулярний аналіз для відновлення рослин зі специфічними комбінаціями точних геномних модифікацій

Події, які відбувалися у пшениці при використанні трансформації за допомогою донорної ДНК та конструкцій нуклеази "цинкових пальців", приводили до інтеграції послідовності донорної молекули в одну або більше копій цільового ендогенного локуса. Як було продемонстровано раніше у Прикладі 6, опосередкована ZFN геномна модифікація здійснює одночасне редагування множинних алелів у множині субгеномів. Штучне схрещування подій трансформації може послідовно використовуватися для селекції на специфічні комбінації точних геномних модифікацій. Наприклад, штучне схрещування трансформаційних подій, які одержували у Прикладі 5, що точно модифікувало гени AHAS за допомогою S653N мутації, можна використовувати для одержання рослин пшениці, що мають S653N мутацію або у специфічному субгеномі, у будь-якій комбінації множинних субгеномів, або в усіх трьох субгеномах.

Подібного до цього, самозапилення трансформаційних подій, що мають геномні модифікації у множинних копіях цільового ендогенного локусу, можуть послідовно використовуватися для одержання подій пшениці, що мають S653N мутацію тільки у специфічному субгеномі. Подальше самозапилення трансформаційних подій є особливо корисним для видалення небажаних геномних модифікацій з такої події, таких як неправильне редагування однієї або більше копій цільового ендогенного локусу.

Молекулярні та фенотипічні аналізи, такі як ті, що описані раніше, можуть використовуватися для одержання профілю успадковування специфічних геномних модифікацій у потомстві, що одержане в результаті штучного схрещування та самозапилення подій трансформації.

Успадковування та експресія точних геномних модифікацій у пшениці

Для підтвердження стабільної експресії та успадковування фенотипу AHAS толерантності до гербіцидів, що забезпечується мутацією, яку несуть події трансформації пшениці, одержані у Прикладі 5, T1 насіння з трьох подій пшениці піддавали молекулярному та фенотипічному аналізу. У трьох незалежних подіях у пшениці кожна несла інтегровану S653N мутацію у гені AHAS, що розміщується у межах A-геному.

Т1 насіння одержували шляхом самозапилення кожної Т0 події. Насіння піддавали стерилізації поверхні та розмножували in vitro шляхом субкультивування стерилізованого насіння на середовищі для розмноження так, як було описано раніше. Через 10 днів росту при 24°C в умовах фотоперіоду 16/8 годин (світло/темрява), видаляли кореневу систему розмножених проростків та проростки переносили на середовище для укорінення, що містить 200 нМ Імазамоксу® (імідазолінон). Проростки інкубували протягом 2-3 тижнів за тих самих умов та реєстрували присутність або відсутність повторного росту коріння. Тканину листя, яку збирали з кожного проростка, використовували для екстракції ДНК та ПЛР аналізу для визначення присутності модифікованого AHAS гена при використанні праймерів AHAS_3F1 та AHAS_3R1 (SEQ ID NO:95 та SEQ ID NO:96) та завершували так, як було описано раніше. Електрофоретичне розділення одержаних продуктів ПЛР на агарозному гелі використовували для визначення присутності модифікованого гена AHAS. Ампліфікація тільки продукту ПЛР у вигляді фрагмента розміром 750 п.о. свідчила про відсутність модифікованого гена AHAS. На противагу до цього, ампліфікація тільки фрагмента розміром 850 п.о. свідчила про присутність модифікованого гена AHAS у гомозиготному стані. Крім того, ампліфікація як фрагменту розміром 750 п.о., так і фрагменту розміром 850 п.о., свідчила про присутність модифікованого гена AHAS у гемізиготному стані.

Після цього аналіз хі-квадрату використовували для підтвердження успадковування модифіковано гена AHAS як одиничної генетичної одиниці. Очікуване успадковування за Менделем спостерігали у поколінні Т1 для кожної з трьох подій трансформації пшениці. Модифікований AHAS ген піддавався розщепленню у співвідношенні 3:1, як очікувалося для ПЛР аналізу, що забезпечує одержання домінантного маркера (Таблиця 16) у Т1 проростках. Подібно до цього, толерантність до Імазамоксу® показала розщеплення 3:1, як і очікувалося для домінантного фенотипу толерантності до AHAS гербіциду, що забезпечувалося S653N мутацією (Таблиця 17) у Т1 проростках.

Таблиця 16

Розщеплення модифікованого AHAS гена у Т1 проростках, що одержані в результаті самозапилення трансформованих рослин пшениці з Прикладу 5.

Подія	Кількість рослин Т1	Кількість рослин Т1 з екзогенною послідовністю	Кількість рослин Т1 без екзогенної послідовності	Виявлене співвідношення розщеплення	Р-значення
mb1k-7783-1-1	25	19	6	3:1	p<0,05
yr00-7794-1-1	54	44	10	3:1	p<0,05
yt02-7786-1-1	33	27	6	3:1	p<0,05

Таблиця 17

Розщеплення фенотипу толерантності до Імазамоксу® у Т1 проростках, що одержані в результаті самозапилення трансформованих рослин пшениці з Прикладу 5.

Подія	Кількість рослин Т1	Кількість рослин Т1 з IMI толерантністю	Кількість рослин Т1 без IMI толерантності	Виявлене співвідношення розщеплення	Р-значення
mb1k-7783-1-1	25	19	6	3:1	p<0,05
yr00-7794-1-1	54	44	10	3:1	p<0,05
yt02-7786-1-1	33	27	6	3:1	p<0,05

Стабільність експресії модифікованого гена AHAS підтверджували за допомогою його відповідності фенотипу толерантності до AHAS гербіциду. Повну відповідність спостерігали між присутністю однієї або більше копій модифікованого AHAS гена та толерантністю до Імазамоксу®

Самозапилення та штучне схрещування для відновлення рослин зі специфічними комбінаціями точних геномних модифікацій

Штучне схрещування між подіями трансформації пшениці, одержаними у Прикладі 5, можуть використовуватися для одержання рослин пшениці, які мають S653N мутацію у специфічному

субгеномі, у множинних субгеномах або в цсіх трьох субгеномах.

Для одержання гомозиготних рослин пшениці, що мають S653N мутацію у специфічному субгеномі, три події у пшениці у відповідності з Прикладом 5 піддавали самозапиленню та одержували Т1 насіння. Ці три події; mb1k-7783-1-1, yw06-7762-2-1 та yw06-7834-1-1, відбирали для наявності гемізиготних геномних модифікацій AHAS в А-геномі, В-геномі та D-геномі, відповідно. Приблизно 15 насінин Т1 з кожної події розмножували та вирощували за умов вирощування у теплиці для одержання насіння Т2. Листовий матеріал, який отримували з кожної рослини Т1, використовували для екстракції ДНК, та проводили ПЛР аналізи для визначення зиготності модифікованого AHAS гена. Цей ПЛР аналіз на зиготність проводили для ампліфікації фрагмента кожної з трьох гомологічних копій ендогенного гена AHAS у межах ділянки, що містить зв'язувальний сайт для ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB190350), та для включення варіації геномної нуклеотидної послідовності. Достатню кількість варіацій геномної нуклеотидної послідовності включали для диференціації між AHAS гомологами, так, що одержані реплікони могли бути однозначно приписані (на рівні послідовності) до субгеному пшениці, від якого вони походять. Пари праймерів синтезували при використанні SP1 та SP2 послідовностей Illumina™ на 5' кінці для забезпечення сумісності з хімією секвенування шляхом синтезу Illumina™. Синтезовані праймери також включали фосфоротіоатний зв'язок на виступаючих 5' та 3' нуклеотидах. 5' фосфоротіоатний зв'язок допомагав забезпечити захист від екзонуклеазної деградації SP1 та SP2 послідовностей Illumina™. Крім того, 3' фосфоротіоатний зв'язок поліпшував ПЛР специфічність для ампліфікації цільових AHAS послідовностей при використанні ПЛР у режимі вкл.-викл. (Yang та ін., (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun., Mar. 4: 328(1): 265-72). Послідовності пари праймерів забезпечуються у Таблиці 18.

Таблиця 18

Послідовності праймерів, що використовуються для оцінки зиготності модифікованого гена AHAS у тран генних подіях пшениці з Прикладу 5.

Назва праймера	Послідовність праймера (5'→3')	SEQ ID NO:
AHASs653ZFN.F2	a*cactctttccctacacgacgctcttccgatctGCAATCAAGAAGATGCTTGAGAC*C	297
AHASs653ZFN.R1	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctTCTTTTGTAGGGATGTGCTGTCA*T	298

Зірочка (*) вказує фосфоротіоатний зв'язок; маленькі літери означають SP1 та SP2 послідовності, а великі літери позначають геномну ДНК послідовність.

Одержані ПЛР амплікони готували для глибокого секвенування так, як описано раніше, та піддавали секвенуванню при використанню пристрою Illumina MiSEQ™ для одержання послідовностей фрагментів розміром 250 п.о. зі спареними кінцями у відповідності з інструкціями виробника. Одержані фрагменти послідовності піддавали комп'ютерній обробці так, як було описано раніше, для приписування кожного фрагменту до зразка (на основі штрих коду) та субгеному, від якого він походить (на основі нуклеотидної варіації, що відрізняється між гомологічними копіями AHAS гена), та для оцінки фільтрування характеристик для забезпечення того, що тільки послідовності з високою якістю використовували для подальших аналізів. Розроблені покупцем прописи PERL та ручну обробку даних у MICROSOFT EXCEL 2010™ (Microsoft Corporation) використовували для обробки даних та визначення модифікованого гена AHAS у кожній події Т1 у пшениці.

Оскільки інтеграція pDAS000267 у локус ендогенного AHAS приводила тільки до відмінності розміром 95 п.о. між алелем дикого типу (немодифікованим) та одержаним трансгенним (модифікованим) алелем, ПЛР аналіз зиготності передбачався для ампліфікації як модифікованого гена AHAS, так і такого дикого типу. У зв'язку із цим Т1 рослини, гомозиготні за цільовою геномною модифікацією, передбачалися як такі, які продукують тільки фрагменти послідовності, які походять від ампліфікації трансгенного алеля у модифікованому локусі AHAS. Ці алелі відрізняються на рівні послідовності шістьма мутаціями, що є спеціально введеними в екзон AHAS у pDAS000267 (наприклад, дві мутації, що кодують S653N мутацію, та чотири оптимізовані за кодонами синонімічні мутації, які розміщуються у різних положеннях сайту зв'язування ZFN 29732, запобігали повторному розщепленню інтегрованого донора). Т1 рослини, гемізиготні за цільовою геномною модифікацією, очікувалися як такі, що продукують

фрагменти послідовності, які мають походження як від алеля дикого типу, так і від трансгенного алеля у модифікованому AHAS локусі. У свою чергу, T1 рослини без модифікованого гена AHAS передбачалися як такі, що продукують тільки фрагменти послідовності, що походять від алеля дикого типу у модифікованому локусі AHAS. На основі ПЛР аналізу зиготності були ідентифіковані T1 рослини, гомозиготні за S653N мутацією тільки у A-геномі, B-геномі або D-геномі (Таблиця 19).

Таблиця 19

Результати ПЛР аналізу зиготності для T1 рослин,
які одержані шляхом самозапилення трансгенних подій пшениці з Прикладу 5

Подія	T1 рослина	A-геном		B-геном		D-геном		Генотип[3]
		Кільк. фрагментів ДТ[1]	Кільк. РЕД фрагментів[2]	Кільк. фрагментів ДТ	Кільк. РЕД фрагментів	Кільк. фрагментів ДТ	Кільк. РЕД фрагментів	
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-29	39,305	46,481	92,167	2,011	85,048	2,222	AaBBDD
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-31	95,696	61,451	203,228	3,913	200,232	4,087	AaBBDD
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-33	32,608	27,270	67,551	1,440	70,588	1,632	AaBBDD
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-39	37,172	56,416	76,005	1,693	77,899	1,787	AaBBDD
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-41	31,782	37,945	74,540	1,478	76,916	1,892	AaBBDD
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-43	3,784	93,125	189,570	4,164	160,769	3,931	aaBBDD
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-46	208,627	4,902	241,948	4,567	247,912	5,094	AABBDD
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-47	66,472	39,215	134,076	2,464	126,823	2,613	AaBBDD
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-49	83,048	1,906	85,267	1,586	87,773	1,794	AABBDD
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-53	41,810	34,455	81,446	1,603	82,871	1,776	AaBBDD
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-55	73,129	48,692	164,791	3,233	155,375	3,205	AaBBDD
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-57	2,971	119,900	97,509	2,161	96,476	2,563	aaBBDD
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-58	2,076	60,517	62,638	1,444	59,721	1,827	aaBBDD
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-59	1,777	78,101	56,566	1,239	55,302	1,326	aaBBDD
mb1k-7783-1	mb1k-7783-1-61	64,093	57,599	135,703	2,713	132,205	2,863	AaBBDD
yw06-7762-2	yw06-7762-2-23	13,123	374	21,286	532	21,471	560	AABBDD
yw06-7762-2	yw06-7762-2-24	56,120	1,382	87,745	1,635	82,753	2,170	AABBDD
yw06-7762-2	yw06-7762-2-25	39,091	1,053	1,525	38,594	61,284	1,578	AAbbDD
yw06-7762-2	yw06-7762-2-27	24,551	804	1,428	19,364	37,500	1,184	AAbbDD
yw06-7762-2	yw06-7762-2-28	44,494	1,234	32,935	18,811	64,736	1,733	AABbDD
yw06-7762-2	yw06-7762-2-29	33,554	964	22,898	11,718	45,887	1,221	AABbDD

Подія	T1 рослина	A-геном		B-геном		D-геном		Генотип[3]
		Кільк. фрагментів ДТ[1]	Кільк. РЕД фрагментів[2]	Кільк. фрагментів ДТ	Кільк. РЕД фрагментів	Кільк. фрагментів ДТ	Кільк. РЕД фрагментів	
yw06-7762-2	yw06-7762-2-30	33,410	1,011	1,481	26,659	46,214	1,430	AAbbDD
yw06-7762-2	yw06-7762-2-31	56,639	1,516	44,649	17,155	85,830	2,116	AABbDD
yw06-7762-2	yw06-7762-2-32	45,753	1,223	35,723	13,649	69,858	1,781	AABbDD
yw06-7762-2	yw06-7762-2-33	12,239	306	17,611	333	18,324	498	AABBDD
yw06-7762-2	yw06-7762-2-34	38,709	1,001	32,109	14,549	61,150	1,620	AABbDD
yw06-7762-2	yw06-7762-2-35	48,185	1,329	40,719	16,138	75,876	1,953	AABBDD
yw06-7762-2	yw06-7762-2-36	44,420	1,096	71,463	1,374	72,604	1,721	AABBDD
yw06-7762-2	yw06-7762-2-37	23,752	685	37,126	796	36,283	941	AABBDD
yw06-7834-1	yw06-7834-1-28	43,467	1,092	68,043	1,317	65,748	1,677	AABBDD
yw06-7834-1	yw06-7834-1-29	47,463	1,177	72,531	1,390	38,007	14,387	AABBDd
yw06-7834-1	yw06-7834-1-31	51,138	1,484	77,266	1,797	1,770	27,955	AABBdd
yw06-7834-1	yw06-7834-1-32	42,666	1,336	70,422	1,578	38,234	17,932	AABBDd
yw06-7834-1	yw06-7834-1-33	33,075	907	55,545	1,331	28,610	10,916	AABBDd
yw06-7834-1	yw06-7834-1-34	47,971	1,277	78,765	1,671	1,536	29,627	AABBdd
yw06-7834-1	yw06-7834-1-35	44,355	1,043	74,365	1,347	68,161	1,634	AABBDD
yw06-7834-1	yw06-7834-1-36	67,661	1,788	93,068	2,329	2,214	31,935	AABBdd
yw06-7834-1	yw06-7834-1-37	33,663	826	49,051	973	52,989	1,274	AABBDD
yw06-7834-1	yw06-7834-1-38	45,974	1,080	67,706	1,258	67,774	1,619	AABBDD
yw06-7834-1	yw06-7834-1-39	2,687	27,436	88,976	2,084	92,612	2,892	AABBDD
yw06-7834-1	yw06-7834-1-40	62,142	1,713	93,532	2,233	49,886	21,129	AABBDd
yw06-7834-1	yw06-7834-1-41	50,781	1,381	77,168	1,696	37,412	14,167	AABBDd
yw06-7834-1	yw06-7834-1-42	44,020	1,233	61,262	1,517	1,374	27,505	AABBdd
yw06-7834-1	yw06-7834-1-43	68,958	1,456	48,972	1,009	91,624	2,062	AABBDD

[1]Кількість фрагментів послідовності, що походять від вказаного субгеному, та таких, що мають послідовність гаплотипу, яка відповідає такій дикого типу (немодифікована) локусу AHAS. Використання позначення “ДТ” означає дикий тип.

[1]Кількість фрагментів послідовності, що походять від вказаного субгеному, та таких, що мають послідовність гаплотипу, яка відповідає такій трансгенного (модифікованого) локусу AHAS. Використання “РЕД” позначає редагований.

[3]Генотип для Т1 рослин, де великі та маленькі літери позначають присутність локусів AHAS дикого типу та трансгенних локусів у вказаному субгеномі, відповідно. Наприклад, AaBBDD означає, що Т1 рослина має гемізиготну модифікацію геномного AHAS у А-геномі та гомозиготні локуси AHAS дикого типу у В- та D-геномах. Зиготність у кожному з трьох ендогенних локусів AHAS визначається із частоти фрагментів послідовності, які відповідають алелям дикого типу та модифікованим алелям, що походять від кожного субгеному. Гемізиготні генотипи мають подібну частоту алелів дикого типу та модифікованих алелей, що походять від ендогенного локусу AHAS, де гомозиготні генотипи демонструють, головним чином, алелі дикого типу або модифіковані алелі. Низька частота альтернативних алелей, що походять від гомозиготних локусів AHAS, забезпечується завдяки ПЛР химеризму між фрагментами, що мають походження від різних субгеномів.

Кваліфікований спеціаліст у даній галузі техніки може використовувати послідовні цикли штучного схрещування між різними подіями трансформації у пшениці у комбінації з описаним аналізом ПЛР зиготності для одержання гомозиготних рослини пшениці, що мають S653N мутацію у будь-якій комбінації множинних субгеномів (наприклад, А-геном та В-геном, А-геном та D-геном або В-геном та D-геном), або в усіх трьох субгеномах. Наприклад, штучне схрещування Т1 рослини mb1k-7783-1-43 (тобто, генотип aaBBDD) з Т1 рослиною yw06-7762-2-25 (тобто, генотип AAbbDD) буде забезпечувати одержання Т2 насіння, що є гемізиготним за модифікованими генами AHAS в А-геномі та В-геномі; тобто з генотипом AaBbDD. У зв'язку із цим ріст та самозапилення Т2 рослин буде забезпечувати одержання розщеплення Т3 насіння для гомозиготних генотипів для модифікованих генів AHAS у А- та В-геномах (тобто, генотип aabbDD), який може бути ідентифікований при використанні описаного ПЛР аналізу зиготності.

Приклад 10: Розробка системи трансформації для поетапного стекінгу екзогенних трансгенів в ендогенному локусі AHAS пшениці

Локус ендогенного гена AHAS у пшениці відбирали як модельний локус для розробки опосередкованої ZFN екзогенної системи трансформації для одержання рослин з одним або більше трансгенами, положення яких є чітко визначеним у тому самому положенні у геномі. Системи трансформації дозволяють здійснювати паралельний (одночасна інтеграція одного або більше трансгенів) або послідовний стекінг (послідовна інтеграція одного або більше трансгенів) точно у тому самому положенні у геномі. Крім того, система трансформації включає одночасний паралельний або послідовний стекінг у множинних алелях множинних субгеномів. Ці стратегії використовують введення мутацій у ген AHAS, що забезпечує толерантність до гербіцидів групи В (наприклад, інгібіторів ALS, таких, як імідазолінон або сульфонілсечовина).

Опосередковану ZFN інтеграцію донорної ДНК у локус AHAS дикого типу (чутливий до гербіцидів) використовували для введення трансгену(ів) та мутації в ендогенний ген AHAS, що надає толерантності до імідазолінонів, дозволяючи, таким чином, проводити регенерацію правильно націлених рослин, які мають толерантність до селективного агенту на основі імідазолінону.

Стекінг другого(их) трансгену(ів) у локусі AHAS досягається шляхом інтеграції донорної ДНК, що вводить один або більше додаткових трансгенів та надає чутливості до імідазолінонів, а також толерантності до сульфонілсечовин, дозволяючи, таким чином, здійснювати регенерацію правильно націлених рослин при використанні селективного агенту на основі сульфонілсечовини.

Стекінг третього трансгену досягається шляхом інтеграції донорної молекули, яка вводить додатковий(і) трансген(и) та надає чутливості до сульфонілсечовини та толерантності до імідазолінонів, дозволяючи, таким чином, здійснювати регенерацію правильно націлених рослин при використанні селективного агенту на основі імідазолінону.

Як такі, безперервні цикли послідовного стекінгу трансгенів є можливими шляхом використання донорної ДНК, що вводить трансген(и) та мутації в ендогенний ген AHAS, для диференційного повторення циклів між селективними агентами на основі імідазолінону та сульфонілсечовини. Трансгени можуть бути інтегровані у межах гена AHAS та піддаються стекінгу при використанні NHEJ та/або HDR шляху. Бажаний шлях відновлення та регенерації може бути визначений шляхом конструювання донорного трансгена.

В одному втіленні екзогенні послідовності, які піддають інтеграції та стекінгу у межах гена AHAS, будуть конструюватися для того, щоб включати 5' та 3' ділянки гомології до геномного сайту інтеграції; тобто, гену AHAS. 5' та 3' ділянки гомології будуть фланкувати інформаційну частину (наприклад, мутацію AHAS та ген, що представляє інтерес). У відповідності із цим, така конструкція буде використовувати HDR для інтеграції та стекінгу донорного полінуклеотиду у межах хромосоми. В іншому втіленні трансгени, які піддаються інтеграції та стекінгу у межах

гена AHAS, будуть конструюватися для того, щоб містити одиничне або подвійне розрізання ZFN сайтів, які фланкують інформаційну частину (наприклад, мутацію AHAS та ген, що представляє інтерес). У відповідності із цим, така конструкція буде використовувати NHEJ для інтеграції та стекінгу донорного полінуклеотиду у межах хромосоми.

Конструювання та одержання донорної ДНК для першого послідовного стекінгу трансгенів у локусі ендогенного AHAS при використанні NHEJ-направленого відновлення ДНК

Донорну ДНК для першого циклу стекінгу трансгенів конструювали для сприяння точній інтеграції донора в ендогенний локус AHAS при використанні опосередкованого ZFN NHEJ-направленого відновлення. Конструкція базувалася на інтеграції дволанцюгової донорної модекули у положенні розриву дволанцюгової ДНК, створеного при використанні розщеплення гомологічної копії ендогенного гена AHAS за допомогою ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350, Фігура 1).

Каркас донорної молекули pDAS000433 (SEQ ID NO:71; Фігура 12) включав декілька ознак полінуклеотидної послідовності. 5' кінці містили послідовність, що була майже ідентичною до ендогенного гена AHAS, що кодується у D-геномі. Цю послідовність створювали з фрагменту, що починався із сайту-мішені для ZFN розщеплення та закінчувався стоп-кодоном AHAS. Крім того, вводили сім навмисних мутацій у послідовність: дві мутації, що кодуються S653N мутацією, та п'ять оптимізованих за кодонами синонімічних мутацій, що розміщуються уздовж сайту зв'язування ZFN 29732. П'ять оптимізованих за кодонами синонімічних мутацій включали для запобігання повторного розщеплення інтегрованого донора. Далі після стоп-кодона йшли 316 п.о. некодуючої послідовності, що відповідає консервативній 3' нетранслюваній ділянці (3'UTR) у гомологах AHAS. Крім того, після 3' послідовності нетранслюваної ділянки йшли сайти зв'язування "цинкових пальців" для ZFN 34480 та 34481 (що кодуються плазмідою pDAB111860) та ZFN 34482 та 34483 (що кодуються плазмідою pDAB111861). Ці сайти зв'язування "цинкових пальців" дозволяли здійснювати самостійне вирізування послідовності AHAS (кодуючи ділянка та 3'UTR), що походить від донора, інтегрованої в ендогенний локус під час другого циклу стекінгу трансгенів. Після цієї ділянки самостійного вирізування сайтів зв'язування "цинкових пальців" йшли два додаткові сайти зв'язування "цинкових пальців", які були фланковані випадковою послідовність розміром 100 п.о. Після цих двох додаткових сайтів зв'язування "цинкових пальців" безпосередньо йшли пари унікальних сайтів розщеплення ендонуклеази, які використовували для вбудовування касети експресії трансгену (тобто, PAT касети експресії, як описується нижче). Два унікальні сайти рестрикції ендонуклеази супроводжувалися двома або більше сайтами зв'язування "цинкових пальців", які знову фланкувалися за допомогою випадковою послідовністю розміром 100 п.о. Це включення чотирьох додаткових сайтів зв'язування "цинкових пальців" дозволяло проводити подальше вирізування трансгенів, інтегрованих у локусі AHAS шляхом послідовного стекінгу трансгенів за відсутності маркера, або здійснювати безперервний послідовний стекінг трансгенів у тому самому положенні у геномі при використанні альтернативного способу стекінгу.

Касету каркасу донора синтезували за допомогою приватної компанії, яка забезпечує послуги у генетиці (GeneArt, Life Technologies), при використанні коротких додаткових фланкуючих послідовностей на 5' та 3' кінцях, для того щоб одержати молекулу донора з виступаючими 5' та 3' кінцями, що були сумісними з лігуванням виступаючих кінців при використанні ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350) при розщепленні ендогенного локусу AHAS.

PAT експресійну касету вбудовували при використанні стандартних способів, відомих кваліфікованому спеціалісту у даній галузі техніки, у касету каркаса донора pDAS000433 між двома унікальними сайтами рестрикції ендонуклеази для одержання касети донорної молекули "QA_pDAS000434" (SEQ ID NO:314; Фігура 19). PAT селективна касета включала промотор, 5' нетранслювану ділянку та інтрон з гена актину (Act1), одержаного з Oryza sativa (McElroy та ін., (1990) The Plant Cell, 2(2): 163-171), після чого йшла синтетична, оптимізована для рослини версія гену фосфінотицинацетил трансферази (PAT), ізольованого з Streptomyces viridochromogenes, який кодує білок, що надає резистентності до інгібіторів глутамінсинтетази, які включають фосфінотрицин, глюфозинат та біалафос (Wohlleben та ін., (1988) Gene, 70(1): 25-37). Ця касета закінчувалася 3'UTR, що включала термінатор транскрипції та сайти поліаденілування з гену 35s вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV) (Chenault та ін., (1993) Plant Physiology 101 (4): 1395-1396). Плазмідну ДНК для "QA_pDAS000434" одержували при використанні системи PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM™ (Promega Corporation, WI) у відповідності з інструкціями виробника.

Після ПЛР ампліфікації "QA_pDAS000434" проводили перетравлювання при використанні рестрикційної ендонуклеаза BbsI для одержання лінійної дволанцюгової донорної молекули

ДНК з виступаючими 5’ та 3’ кінцями, що є сумісними з виступаючими кінцями для лігування, які були одержані при використанні ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350) при розщепленні ендогенного локусу AHAS. ПЛР ампліфікацію здійснювали за допомогою праймерів AHAS_TSdnr1_F1 та AHAS_TSdnr1_R1 (SEQ ID NO: 297 and 298, відповідно), які конструювали для короткої додаткової послідовності, що додавалася до 5’ та 3’ кінців касети каркасу донора “QA_pDAS000434”. Одержані амплікони очищали при використанні набору для очистки Agencourt AMPure™ XP-PCR (Beckman Coulter) та перетравлювали при використанні BbsI (New England Biolabs). Повторно очищали амплікони при використанні набору для очистки Agencourt AMPure™ XP-PCR (Beckman Coulter), після чого проводили преципітацію етанолом та ресуспендували у стерильній воді при концентрації ДНК, що є прийнятною для трансформації пшениці. Використовували стандартні способи, які є відомими спеціалісту у даній галузі техніки, для одержання лінійної дволанцюгової донорної молекули ДНК.

Одержання контрольного бінарного вектора, що кодує AHAS (S653N)

Бінарний вектор pDAS000143 (SEQ ID NO:88, Фігура 10), що містить AHAS (S653N) експресійну касета та PAT селективну касету, конструювали та поєднували при використанні навичок та методик, що є загальновідомими у даній галузі техніки, як описано раніше. Плазмідну ДНК для бінарного вектора одержували при використанні системи PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM™ (Promega Corporation, WI) у відповідності з інструкціями виробника. Бінарний вектор pDAS000143 піддавали трансформації у клітини пшениці як контроль.

Біолістична трансформація для одержання подій у пшениці шляхом першого стекінгу трансгенів у локус ендогенного AHAS при використанні NHEJ-направленого відновлення ДНК

Загальну кількість 55468 щитків незрілих зиготних зародків з донорної лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH одержували для біолістичної доставки ДНК, як було описано раніше. Вкриті ДНК частинки золота готували при використані композицій, що описані вище. Для здійснення трансфекції при використанні лінійної дволанцюгової донорної ДНК, що походить від “QA_pDAS000434” або pDAS000433, донорну ДНК змішували у 5:1 молярному співвідношенні з плазмідної ДНК для pDAB109350 (що кодує ZFN 29732 та 29730). Трансфекцію здійснювали при використанні pDAS000143, при цьому використовували частинки золота, які були вкриті тільки плазмідною ДНК для pDAS000143.

Біолістичну трансфекцію здійснювали так, як описано раніше. Після бомбардування трансфіковані щитки інкубували при 26°C у темряві протягом 16 годин перед перенесенням на середовище для індукції калусів.

Дві різні стратегії хімічної селекції використовували для збагачення на регенеровані рослини пшениці, що мають інтегровану лінійну дволанцюгову донорну молекулу. Перша стратегія базувалася на використанні Імазамоксу® для відновлення подій у рослинах пшениці, що мають донорну молекулу, точно інтегровану в одну або більше гомологічних копій ендогенного гена AHAS при використанні опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування гена. Такі події передбачалися як такі, що мають фенотип AHAS толерантності до гербіцидів, що забезпечується S653N мутацією. Другу стратегію, що базувалася на використанні Баста® (DL-фосфінотрицин), використовували для відновлення подій, які мали донорну молекулу, інтегровану у випадковому (за відсутності націлювання) положенні у геномі пшениці, або неналежним чином інтегровану одну або більше гомологічних копій ендогенного гена AHAS шляхом опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування гену. Ці події очікувалися як такі, що демонструють фенотип толерантності до гербіциду Баста, що надається PAT геном, але не обов’язково фенотип толерантності до AHAS гербіцидів, що забезпечується S653N мутацією. Мета другої стратегії хімічної селекції полягала у тому, щоб дозволити проводити кількісну оцінку частоти точної (націленої) проти випадкової (ненацільованої) інтеграції донора, що піддається кількісній оцінці, а також частоти правильної та неправильної інтеграції в ендогенному локусі AHAS. Дві стратегії хімічної селекції описуються у Таблиці 20.

Таблиця 20

Стратегії хімічної селекції, що використовуються для регенерації рослин пшениці, які мають інтегровану донорну молекулу (“IMI” означає селекцію на ІМАЗАМОКС, а “PPT” означає селекцію на Баста®).

Стадія регенерації рослини	IMI селекція	PPT селекція
Індукція калусів (CIM)	150 нМ	Жодного
Регенерація рослини (DRM)	150 нМ	5 мг/мл PPT
Укорінення (RM)	200 нМ	5 мг/мл PPT

Загальну кількість 34546 та 23550 трансфікованих щитків піддавали селекції на Імазамокс® та Баста®, відповідно. Для кожної стратегії щитки культивували у темноті на середовищі для індукції калусів при температурі 24°C протягом 2 тижнів. Одержані калуси піддавали субкультивуванню спочатку на свіжому середовищі для індукції калусів та витримували у тих самих умовах протягом додаткових 2 тижнів. Соматичні ембріогенні калуси (SEC) переносили на середовище для регенерації рослин та культивували протягом 2 тижнів при температурі 24°C в умовах фотоперіоду годин 16/8 (світло/темрява) у вегетаційній камері. Регенероваті експлантати переносили на середовище для укорінення та культивували за тих самих умов протягом 2-3 тижнів. Для селекції на Імазамокс® регенеровані рослини піддавали субкультивуванню загалом протягом трьох разів на середовищі для укорінення. У кінці кожного циклу коріння регенерованих рослин видаляли, та рослини знову субкультивували на середовищі для укорінення за тих самих умов. Експлантати з корінням переносили у ґрунт та вирощували в умовах теплиці. T_1 насіння збирали від індивідуальних рослин, після цього спаковували індивідуальні колоски для запобігання перехресного схрещування.

Щитки експлантатів, які піддавали бомбардуванню частинками золота, вкритими pDAS000143, використовували для моніторингу жорсткості селекції як для стратегії хімічної селекції на основі Імазамоксу®, так і Баста®. Рослини, трансформовані при використанні pDAS000143, регенерували при використанні процесу, описаного вище.

Загальну кількість 36 рослин пшениці відновлювали при використанні кожної стратегії селекції на щитках експлантатів, трансфікованих при використанні pDAS000143. Молекулярний аналіз цих подій при використанні аналізу гідролізу зонда, описаного у Прикладі 6, підтвердив, що усі регенеровані рослини пшениці несли принаймні одну довільним чином інтегровану копію інсерту pDAS000143. Ці результати свідчать про те, що умови селекції при використанні Імазамоксу® та Баста® були у достатній мірі жорсткими для забезпечення низького показника вислизання (тобто регенерованих рослин пшениці, що не були трансформованими), у той час як дозволяли здійснювати відновлення подій, які несуть одну або більше інтегрованих копій донорних полінуклеотидів AHAS (S653N) та PAT, відповідно.

Жодної рослини пшениці, що має фенотип толерантності до гербіциду на основі AHAS, що забезпечується S653N мутацією, не було регенеровано в результаті селекції на Імазамокс® за специфічних умов селекції, описаних вище. Оскільки селекція на Імазамокс® передбачалася тільки для регенерації рослин пшениці, що мають точну інтеграцію донорної молекули в одну або більше копій гомологічного гена AHAS, ці результати дають змогу передбачити, що режим хімічної селекції був субоптимальним, а такаж що умови повинні бути модифіковані для точної опосередкованої ZFN NHEJ-направленої інтеграції pDAS000433 донора у локус ендогенного гена AHAS, або те, що масштаб трансформації не був прийнятним для умов хімічної селекції, що використовуються у даній роботі. На противагу до цього, 1652 щитків рослин пшениці було регенеровано в результаті селекції при використанні Баста®. Оскільки Баста® передбачався для регенерації рослин пшениці, які мають як націлену та і не націлену (випадкову) інтеграцію донора, молекулярна характеристика цих подій може забезпечити розрізнення між націленою та не націленою інтеграцією донора, що може забезпечити вказівки щодо уточнення умов селекції на основі Імазамоксу®.

Молекулярна характеристика рослин пшениці, відібраних при використанні Баста® для підтвердження першого стекінгу трансгенів у локусі ендогенного гена AHAS

Загальну кількість 1162 рослини пшениці, які регенерували в результаті селекції при використанні Баста®, піддавали молекулярній характеристиці для оцінки частоти націленої та ненаціленої (випадкової) інтеграції донора, а також частоти націленої правильної та неправильної інтеграції донора у локуси ендогенного гена AHAS.

Проводили три молекулярні аналізи для кожної рослини пшениці при використанні геномної

ДНК, екстрагованої при використанні набору DNEASY® PLANT DNA EXTRACTION MINI KIT™ (Qiagen) з висушених заморожуванням тканин листя, як було описано раніше.

Перший молекулярний аналіз використовували для підтвердження того, що регенеровані рослини пшениці несли принаймні одну інтегровану копію лінійної дволанцюгової ДНК, що походить від "QA_pDAS000434". Цей аналіз втягував ПЛР аналіз для ампліфікації ділянки промотора актину (Act1), що є присутньою в "QA_pDAS000434" (SEQ ID NO: 92 та 93 для прямого та зворотного праймерів, відповідно), після чого здійснювали електрофоретичне розділення одержаного амплікону на агарозному гелі. Присутність ПЛР фрагменту очікуваного розміру (218 п. о.) свідчила про інтеграцію принаймні однієї копії донорної молекули. З 1162 подій у пшениці 1065 (92%) забезпечували одержання ПЛР фрагменту очікуваного розміру.

Другий молекулярний аналіз використовували для ідентифікації рослин пшениці, які мають донорну молекулу, путативно інтегровану в одну або більше копій локусу ендогенного AHAS. Цей аналіз включав ПЛР аналіз у режимі вкл./викл. при використанні праймера, сконструйованого для гібридизації з ділянкою, яка розміщується вище від сайта зв'язування для ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB190350) в кожній з гомологічних копій ендогенного гена AHAS, та праймера, сконструйованого для гібридизації з ділянкою у межах випадкової послідовності розміром 100 п.о., яка фланкує зв'язувальний сайт для ZFN 34480 та 34481 (що кодуються плазмідою pDAB111860) у "QA_pDAS000434" (SEQ ID NO: 299 та 300 для прямого та зворотного праймерів, відповідно). Кожний праймер конструювали з фосфоротіоатним зв'язком, який розміщується на виступаючі основі, для максимізації специфічності для подовження праймера під час ПЛР ампліфікації. Ампліфікація ПЛР фрагмента з розміром, більшим за 300 п.о., при розділенні при використанні електрофорезу на агарозному гелі розглядалася як прогнозоване підтвердження націленої інтеграції (принаймні частини) донорної молекули в одну або більше копій ендогенного гена AHAS. З 1065 проаналізованих подій у пшениці 543 (51%) ампліфіковані ПЛР фрагменти мали розмір, більший за 300 п.о.

Третій молекулярний аналіз використовували для додаткової характеристики рослин пшениці, що демонструють прогнозоване підтвердження цільової інтеграція донорної молекули в одну або більше копій ендогенного гена AHAS. Аналіз передбачає ПЛР аналіз при використанні пари праймерів, сконструйованих для ампліфікації ділянки розміром 256 п.о. з трьох гомологічних копій ендогенного гена AHAS. Ця ділянка містила зв'язувальний сайт для ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB190350) та для включення варіації геномної нуклеотидної послідовності. Достатня варіація геномної нуклеотидної послідовності включалася для диференціації між гомологами AHAS, так, що одержані амплікони могли бути однозначно приписані (на рівні послідовності) субгеному пшениці, з якого вони походять. Пари праймерів синтезували при використанні Illumina™ SP1 та SP2 послідовностей на 5' кінці, відповідно, для забезпечення сумісності з хімією секвенування шляхом синтезу у відповідності з Illumina™. Синтезовані праймери також містили фосфоротіоатний зв'язок на виступаючих 5' та 3' нуклеотидах. 5' фосфоротіоатний зв'язок забезпечував захист від екзонуклеазної деградації Illumina™ SP1 та SP2 послідовностей, у той час як 3' фосфоротіоатний зв'язок поліпшував ПЛР специфічність для ампліфікації цільових AHAS послідовностей при використанні ПЛР у режимі вкл./викл. Ці послідовності пари праймерів є приведеними у Таблиці 21.

Таблиця 21

Послідовності праймерів, що використовуються для додаткової характеристики рослин пшениці, що мають прогнозоване підтвердження цільової інтеграції донорної молекули в одну або більше копій ендогенного гена AHAS.

Назва праймера	Послідовність праймера (5'→3')	SEQ ID NO:
AHASs653ZFN.F2	a*cactctttccctacacgacgctcttccgatctGCAATCAAGAAGATGCTTGAGAC*C	301
AHASs653ZFN.R3	g*tgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctCAAGCAAACTAGAAAACGCATG*G	302

Зірочка (*) вказує на фосфоротіоатний зв'язок; маленькі літери означають SP1 та SP2 послідовності, а великі літери позначають геномну ДНК послідовність.

ПЛР амплікони, які одержували при використанні третього молекулярного аналізу, готували для глибокого секвенування шляхом здійснення додаткового циклу ПЛР для введення Illumina™

P5 та P7 послідовностей в ампліфіковані фрагменти ДНК, а також штрихового коду послідовності, що може використовуватися для однозначного приписування фрагментів послідовності до зразка, від якого він походить. Цього було досягнуто при використанні праймерів, які були частково комплементарними SP1 та SP2 послідовностям, які додавалися у першому циклі ампліфікації, але також містили індекс зразка та P5 та P7 послідовності. Після ампліфікації одержані продукти піддавали секвенуванню на пристрої Illumina MiSEQ™ для одержання фрагментів послідовності зі спареними кінцями розміром 250 п.о. у відповідності з інструкціями виробника.

Одержані фрагменти послідовності зі спареними кінцями розміром 250 п.о. піддавали комп'ютерній обробці так, як було описано раніше, для приписування кожного фрагменту зразку (на основі штрихового коду) та субгеному, від якого вони походять (на основі нуклеотидної варіації, що забезпечує розрізнення гомологічних копій гена AHAS), та для проведення фільтрування ознаки для забезпечення того факту, що тільки послідовності високої якості використовували для подальших аналізів. Розроблені на замовлення PERL прописи та ручну обробку даних у MICROSOFT EXCEL 2010™ (Microsoft Corporation) використовували так, як описано нижче, для ідентифікації фрагментів, що містять підтвердження для націленої інтеграції донора в одну або більше копій ендогенного гена AHAS.

Оскільки сайт гібридизації для праймера AHASs653ZFN.R3 (Таблиця 21) був також присутній в AHAS 3' нетрансльованій ділянці (UTR) в "QA_pDAS000434", третій молекулярний аналіз дозволяв здійснювати диференціацію між націленою випадковою інтеграцією донора, а також між правильною та неправильною інтеграцією донора в локус однієї або більше копій ендогенного гена AHAS. Рослини пшениці, які мали правильне гемізиготне націлене редагування прогнозувалися як такі, що забезпечують фрагменти послідовності, які одержані в результаті ампліфікації алелей як дикого типу (нередагованих), так і редагованих алелей у кожному модифікованому локусі AHAS. Ці алелі відрізнялися на рівні послідовності сімома навмисними мутаціями, введеними в AHAS екзон у "QA_pDAS000434" (тобто, двома мутаціями, що кодують S653N мутацію, та п'ятьма оптимізованими за кодонами синонімічними мутаціями, розміщеними у сайті зв'язування ZFN 29732, які вводили для запобігання повторного розщеплення інтегрованого донора). Теоретично, частота фрагментів, які відповідають алелям дикого типу та редагованим алелям, будуть виникати у співвідношенні 1:1 для кожного локусу ендогенного AHAS з належним гемізиготним редагуванням. На противагу до цього, рослини пшениці, які мають належне (правильне) гомозиготне націлене редагування прогнозувалися як такі, що забезпечують тільки фрагменти послідовності, що походять від пари редагованих алелей при кожному модифікованому локусі ендогенного гена AHAS. Оскільки пару праймерів, що використовується у третьому аналізі, конструювали для ампліфікації усіх трьох гомологічних копій гена AHAS, очікуване утворення фрагментів, які мають походження від усіх трьох субгеномів пшениці, може також використовуватися для визначення націленої неправильної інтеграції донора (наприклад, інтеграції часткового фрагмента донора або інтеграції донорного фрагмента у неправильній орієнтації). Неправильна націлена інтеграція донора передбачалася як така, що приводить до ампліфікації тільки алеля дикого типу (нередагованого) з кожного модифікованого локусу ендогенного AHAS завдяки ПЛР конкурентному сприянню ампліфікації більш короткого фрагменту дикого типу. У зв'язку із цим, гемізиготна націлена неправильна інтеграція донора передбачається для одержання приблизно половини, оскільки виникає багато фрагментів, які мають походження від субгеному, в який була здійснена інтеграція, у порівнянні із нередагованими субгеномами. Для гомозиготної націленої неправильної інтеграції донора не очікувалося ніяких фрагментів, які походять від субгеному, в який була здійснена інтеграція. Навпаки, ненацілена (випадкова) інтеграція донора передбачалася для одержання рівного співвідношення фрагментів послідовності, які походять від усіх трьох гомологічних копій гена AHAS.

Аналіз послідовності 543 рослин пшениці, які піддавали тестуванню, виявив 38 подій з молекулярним підтвердженням нецільової інтеграції донора в одну або більше копій ендогенного гена AHAS. Подія di01-9632-1-1 мала правильну гемізиготну інтеграцію донора у локус AHAS, що розміщується у B-геномі. Ці результати вказували на присутність як фрагментів дикого типу, так і правильно редагованих фрагментів, які мають походження від B-геному, проте тільки алелі дикого типу мали походження від A- та D-геномів (Таблиця 22). Дві події мали неправильну гемізиготну інтеграцію донора в локусах AHAS в A- та D-геномах, відповідно. Подія yl02-9453-1-2 мала фрагменти як дикого типу, так і неправильно редаговані фрагменти, які походили від D-геному, але тільки алелі дикого типу мали походження від A- та B- геномів. У порівнянні із цим, подія yl02-9552-21-1 мала як фрагменти дикого типу, так і неправильно редаговані фрагменти, які походили від A-геному, тільки алелі дикого типу мали походження від

інших субгеномів.

35 подій, що залишилися, показали молекулярне підтвердження неправильної інтеграції донора принаймні в одну копію ендогенного гена AHAS, де донорна молекула була, ймовірно вкороченою або інтегрованою у неправильній орієнтації (Таблиця 22). Ці події характеризувалися більш низькою, ніж очікувалося, частотою фрагментів, що мають походження від одного або більше субгеномів пшениці. Наприклад, подія yl02-9552-7-1 мала статистично значущу більш низьку частоту фрагментів AHAS дикого типу, які мали походження від B-геному, ніж це очікувалося для нередагованого локусу. 453 події, що залишилися, показали тільки підтвердження випадкової інтеграції донора в інших місцях геному пшениці, що свідчило про те, що ампліфікований продукт з другого молекулярного аналізу найбільш ймовірно утворювався завдяки ПЛР химеризму. Консенсусні послідовності для редагованих алелів були присутніми у B, D та A субгеномах пшениці, події di01-9632-1-1, yl02-9453-1-2 та yl02-9552-21-1 забезпечуються як SEQ ID NO:303, 304 та 305, відповідно.

Таблиця 22

Молекулярне підтвердження інтеграції QA_pDAS000434
в одну або більше гомологічних копій локусу ендогенного гена AHAS

A-геном					
Подія	Кількість фрагментів	% фрагментів	% ДТ	% PE	% IE
di01-9632-1-1	17312	9	99	0	1
yl02-9453-1-2	8548	20	97	3	0
yl02-9552-21-1	3049	10	47	0	53
yl02-9552-7-1	43845	66	100	0	0
gt19-9595-10-1	48681	62	100	0	0
yr00-9553-3-1	16212	16	98	1	0
yr00-9580-9-1	69153	35	97	2	1
yl02-9532-1-1	85431	43	100	0	0
yl02-9532-16-1	14318	29	100	0	0
di01-9603-10-1	825	1*	100	0	0
yl02-9578-1-1	1,662	1*	100	0	0
di01-9603-2-1	833	5*	100	0	0
yc06-9547-1-1	831	1*	100	0	0
yl02-9532-9-1	2168	1*	100	0	0
yc06-9522-1-1	4233	2*	100	0	0
mb1k-9539-31-1	2355	2*	100	0	0
yl02-9503-1-1	1381	1*	100	0	0
mb1k-9546-4-1	1971	2*	100	0	0
di01-9603-18-1	1436	1*	100	0	0
di01-9603-25-1	819	1*	100	0	0
yl02-9503-2-1	1241	1*	100	0	0
di01-9550-14-1	2846	2*	100	0	0
yr00-9580-28-1	708	0*	100	0	0
yl02-9552-19-1	4127	2*	100	0	0
hw12-9569-5-1	1959	1*	100	0	0
gt19-9582-2-1	244	0*	99	0	1
gt19-9593-6-1	9426	7*	100	0	0
mb1k-9539-25-1	982	1*	100	0	0
yl02-9457-7-1	467	0*	100	0	0
yr00-9553-16-1	433	0*	100	0	0
yw06-9345-15-1	146	4*	100	0	0
mb1k-9546-2-1	93058	97	99	0	1
yr00-9541-5-1	131675	93	100	0	0
yl02-9552-47-1	180989	97	100	0	0
gt19-9551-4-1	144978	99	100	0	0
yc06-9340-5-1	96105	98	100	0	0
yc06-9584-2-1	98385	98	100	0	0
yr00-9541-1-1	115671	98	100	0	0

B-геном					
Подія	Кількість фрагментів	% фрагментів	% ДТ	% РЕ	% ІЕ
di01-9632-1-1	9498	5	70	29	1
yl02-9453-1-2	13374	32	97	3	0
yl02-9552-21-1	16817	55	100	0	0
yl02-9552-7-1	6254	9*	100	0	0
gt19-9595-10-1	5146	7*	100	0	0
yr00-9553-3-1	8683	8*	100	0	0
yr00-9580-9-1	1768	1*	98	1	1
yl02-9532-1-1	6644	3*	100	0	0
yl02-9532-16-1	34310	70	100	0	0
di01-9603-10-1	3228	4*	100	0	0
yl02-9578-1-1	2176	1*	100	0	0
di01-9603-2-1	1225	7*	100	0	0
yc06-9547-1-1	723	1*	100	0	0
yl02-9532-9-1	1012	0*	100	0	0
yc06-9522-1-1	3979	2*	100	0	0
mb1k-9539-31-1	2359	2*	100	0	0
yl02-9503-1-1	601	0*	100	0	0
mb1k-9546-4-1	364	0*	100	0	0
di01-9603-18-1	106322	96	100	0	0
di01-9603-25-1	101834	98	100	0	0
yl02-9503-2-1	221040	99	100	0	0
di01-9550-14-1	130434	96	100	0	0
yr00-9580-28-1	174074	99	100	0	0
yl02-9552-19-1	174186	95	100	0	0
hw12-9569-5-1	260971	98	100	0	0
gt19-9582-2-1	67764	99	100	0	0
gt19-9593-6-1	110669	84	100	0	0
mb1k-9539-25-1	75915	96	100	0	0
yl02-9457-7-1	125465	99	100	0	0
yr00-9553-16-1	111825	99	100	0	0
yw06-9345-15-1	3655	93	100	0	0
mb1k-9546-2-1	1448	2*	100	0	0
yr00-9541-5-1	4403	3*	100	0	0
yl02-9552-47-1	2236	1*	100	0	0
gt19-9551-4-1	740	1*	100	0	0
yc06-9340-5-1	620	1*	100	0	0
yc06-9584-2-1	617	1*	100	0	0
yr00-9541-1-1	781	1*	100	0	0
D-геном					
Подія	Кількість фрагментів	% фрагментів	% ДТ	% РЕ	% ІЕ
di01-9632-1-1	170321	86	99	0	1
yl02-9453-1-2	19841	48	68	32	0
yl02-9552-21-1	10665	35	100	0	0
yl02-9552-7-1	15936	24	100	0	0
gt19-9595-10-1	24091	31	100	0	0
yr00-9553-3-1	79529	76	98	1	0
yr00-9580-9-1	128317	64	97	2	1
yl02-9532-1-1	105821	53	100	0	0
yl02-9532-16-1	434	1*	99	1	0
di01-9603-10-1	84718	95	100	0	0
yl02-9578-1-1	152767	98	100	0	0
di01-9603-2-1	14671	88	100	0	0
yc06-9547-1-1	71423	98	100	0	0
yl02-9532-9-1	230632	99	100	0	0
yc06-9522-1-1	167492	95	100	0	0
mb1k-9539-31-1	142061	97	100	0	0

Подія	Кількість фрагментів	% фрагментів	% ДТ	% PE	% IE
yl02-9503-1-1	199717	99	100	0	0
mb1k-9546-4-1	89309	97	100	0	0
di01-9603-18-1	2921	3*	100	0	0
di01-9603-25-1	1715	2*	96	0	4
yl02-9503-2-1	1741	1*	100	0	0
di01-9550-14-1	3140	2*	100	0	0
yr00-9580-28-1	1012	1*	100	0	0
yl02-9552-19-1	5470	3*	100	0	0
hw12-9569-5-1	2479	1*	100	0	0
gt19-9582-2-1	496	1*	99	0	1
gt19-9593-6-1	11821	9*	100	0	0
mb1k-9539-25-1	1898	2*	100	0	0
yl02-9457-7-1	555	0*	100	0	0
yr00-9553-16-1	604	1*	100	0	0
yw06-9345-15-1	150	4*	100	0	0
mb1k-9546-2-1	1191	1*	100	0	0
yr00-9541-5-1	4766	3*	100	0	0
yl02-9552-47-1	3537	2*	100	0	0
gt19-9551-4-1	1171	1*	99	0	0
yc06-9340-5-1	1186	1*	100	0	0
yc06-9584-2-1	1234	1*	100	0	0
yr00-9541-1-1	1566	1*	100	0	0

"Кількість фрагментів" означає кількість фрагментів послідовності, що приписані до субгеному пшениці; "% фрагментів" означає процент фрагментів послідовності, що приписані до субгеному пшениці у формі співвідношення до усіх приписаних фрагментів; "% ДТ" означає процент фрагментів послідовності, що є ідентифікованими як алелі дикого типу (нередаговані); "% PE" означає процент фрагментів послідовності, що відносяться до точної інтеграції донора у субгеном пшениці; "% IE" означає процент фрагментів послідовності, що вказує на неправильну інтеграцію донора у субгеном пшениці; зірочка (*) означає появу статистично значущої меншої кількості фрагментів послідовності, які очікуються для нередагованого локус ендогенного AHAS

Загалом 3% (38/1162) відібраних при використанні Баста® подій у пшениці продемонстрували молекулярне підтвердження націленої інтеграції донора в одну або більше гомологічних копій ендогенного гена AHAS.

Приклад 11: Розробка системи трансформації для послідовного, вільного від екзогенного маркера стекінгу трансгенів у локуси ендогенного AHAS у пшениці

Рослини пшениці, що містять донорний полінуклеотид, інтегрований у межах AHAS локусу для введення S653N мутації, одержували при використанні описаних раніше способів. Наприклад, регенерація події di01-9632-1-1 (Таблиця 23), що демонструє молекулярне підтвердження правильної гемізиготної інтеграції "QA_pDAS000434" у B-геном пшениці демонструє, що донорна ДНК та конструкції нуклеази "цинкових пальців" можуть використовуватися для інтеграції послідовностей донорної молекули в одну або більше копій цільового локусу ендогенного гена AHAS у пшениці. Одержання такої події, що є вільним від будь-яких додаткових трансгенних селективних маркерів, являє собою вихідний процес для здійснення послідовного, вільного від екзогенного трансгенного селективного маркера стекінгу донорного полінуклеотиду у локусі ендогенного AHAS у геномі пшениці. Редаговані події у рослинах одержують при використанні альтернативних умов селекції так, як описано раніше у Прикладі 10.

Описані раніше умови проведення селекції можуть бути модифіковані при використанні ряду методик. Інші підходи можуть застосовуватися для регенерації рослини пшениці з точною інтеграцію S653N мутації (як кодується "QA_pDAS000434" або pDAS000433) в одну або більше копій локусу ендогенного AHAS, за відсутності використання трансгенного селективного маркера.

Два додаткові підходи можуть використовуватися для регенерації рослин пшениці з точною інтеграцією S653N мутації в одну або більше копій локусу ендогенного AHAS за відсутності застосування трансгенного селективного маркера.

Наприклад, умови селекції на основі Імазамоксу® модифікують для включення селекції на різних етапах культивування та/або більш низьких концентрацій гербіциду. У відповідності із

цим селекція на стадії регенерації рослин послаблюється шляхом зниження концентрації Імазамоксу®, що додається до середовища для регенерації рослин, або, як інша альтернатива, застосування гербіциду на цьому етапі регенерації рослини повністю усувається. Як такий, спостерігається більш сильний ріст регенерованих проростків, що, таким чином, забезпечує одержання більш великих проростків, які є менш чутливими до пошкодження тканин, коли піддаються субкультивуванню на середовищі для укорінення. Крім того, може бути необхідним відокремити проростки від ембріогенних калусів, від яких вони походять. Менші проростки є більш чутливими до пошкодження тканин, що може приводити до некрозу тканин та потенційної втрати трансформованих проростків під час субкультивування. Проведення селекції при використанні Імазамоксу® на етапі індукції калусів допомагає обмежити ембріогенез на основі нетрансформованих клітин, у той час як проведення селекції на етапі укорінення буде забезпечувати ефективну селекцію для проростків з точною інтеграцією pDAS000433 в одній або більше копій локусу ендогенного AHAS, що є необхідним для одержання фенотипів AHAS толерантності до гербіцидів, що забезпечується S653N мутацією. Успіх таких стратегій селекції при використанні Імазамоксу® для одержання точно редагованих рослин пшениці продемонстровано у Прикладі 5.

В іншому прикладі використовують різні системи трансформації для одержання рослин пшениці з точно інтегрованою донорною ДНК. Наприклад, трансформація на основі протопластів може використовуватися для одержання індивідуальних калусів, де кожний калус має походження від одичної клітини. Одержані з протопластів калуси забезпечують декілька переваг у порівнянні із калусами, що одержані в результаті біолістичного бомбардування щитків незрілих зиготичних зародків. На відміну від калусу, що одержаний в результаті біолістичного бомбардування та який є химерним як для трансформованих, так і для нетранформованих клітин, калус, що походить від протопласту, є клональним. Таким чином виживання у калусах, що походять від трансформованого протопласту, в якому відбулася точна інтеграція pDAS000433, не може бути порушене завдяки присутності сусідніх нетрансформованих клітин, коли піддається селекції при використанні Імазамоксу®. У випадку калусів, що одержані в результаті біолистичного бомбардування, химерний склад калусу означає, що виживання клітин з точною трансформацією може бути порушене з причини загибелі оточуючих нетрансформованих клітин при здійсненні селекції при використанні Імазамоксу®. Системи трансформації на основі протопластів також забезпечують перевагу масштабування у порівнянні із біолістичним бомбардуванням, оскільки набагато більше клітин може бути трансформовано для даної кількості зусиль, забезпечуючи, таким чином, більш високу достовірність щодо регенерації рослин пшениці з точною інтеграцією pDAS000433 в одну або більше копій ендогенного гена AHAS. Декілька систем трансформації для пшениці на основі протопластів було описано в опублікованій науковій літературі (Qiao та ін. (1992) Plant Cell Reports 11:262-265; Ahmed та Sagi (1993) Plant Cell Reports 12: 175-179; Pauk та ін. (1994) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 38: 1-10; Не та ін. (1994) Plant Cell Reports 14: 92-196; Gu та Lang (1997) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50: 139–145; та Li та ін. (1999) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58: 119–125).

Було проведено серії експериментів для визначення оптимальних умов селекції для регенерації рослин пшениці, що експресують AHAS(S653N) мутацію, яка надає стійкості до Імазамоксу®, для системи трансформації на основі протопластів, таких як ті, що описані вище.

Умови проведення селекції при використанні Імазамоксу® піддавали оптимізації при використанні протопластів, що одержані із суспензійних культур клітин, які походять від соматичних ембріогенних калусів (SEC) лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH. У той час як протопласти, що походять від Bobwhite MPB26RH не є тотипотентними (тобто, не можуть використовуватися для регенерації цільних рослин), умови селекції, встановлені для збагачення на події експресії AHAS(653N) мутації, передбачаються як такі, що можуть бути перенесені на будь-яку систему трансформації, яка базується на тотипотентному генотипі пшениці, що визнається спеціалістами у даній галузі техніки. Проведені експерименти встановили базисну толерантність донорної лінії пшениці дикого типу культивару Bobwhite MPB26RH (S653/S653 генотип, який надає чутливості до імідазолінонів) до Імазамоксу®. Застосування умов селекції при використанні Імазамоксу®, більш жорстких, ніж базисна толерантність, буде значно збагачуватися на експресію AHAS(S653N) мутації у трансформованих клітинах.

Також застосовують додаткові способи трансформації. Наприклад, може бути одержана суспензійна культура клітин для лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH. Соматичний ембріогенний калус (SEC) індукують з незрілих зиготичних зародків лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH так, як описано раніше. Лінію калусів зі швидким ростом відбирають після проведення шести циклів субкультивування на середовищі для індукції калусів. Для кожного

циклу субкультивування калуси, що мають швидкий ріст, переносять на нове середовище для індукції калусів та культивують у темряві при 26°C протягом 14 днів.

Суспензійна культура клітин ініціюється шляхом перенесення 1 граму калусів лінії калусів зі швидким ростом у колбу, що містить 20 мл рідкого ростового середовища та піддається культивуванню при 25°C у темряві на шюттель-апараті з обертанням при швидкості 90 об./хв. Кожні сім днів суспензійну культуру клітин піддають субкультиванню шляхом пропускання культури через густу сітку для видалення грудок клітин, що мають діаметр, більший за 2 мм, та заміни двох третин культурального середовища свіжим середовищем. Через 3 місяці повторюваного фільтрування та субкультивування одержують суспензійну культуру клітин, що мають походження від SEC та характеризують швидким ростом.

Потім протопласти ізолювали від суспензійної культури клітин, що походять від SEC. Одержували приблизно 4 грами (сира вага) грудок клітин при пропусканні 7-денної суспензійної культури клітин, що мають походження від SEC через густу сітку. Грудки клітин піддавали перетравлюванню з одержанням перетравленої суміші калусів пшениці так, як було описано раніше, для вивільнення протопластів. Вихід протопластів суспензійної культури клітин, що походять від SEC, оцінювали при використанні гемоцитометра Нейбауера. Використовували забарвлювання Evans блакитним для визначення кількості відновлених живих клітин.

Вибирали умови селекції культури протопластів при використанні гербіциду Імазамоксу®. Система на основі гранул агарози використовується для культури протопластів. Приблизно 1 x 10^6 протопластів осаджували шляхом слабкого центрифугування та видаляли супернатант. Протопласти ресуспендували шляхом обережного перемішування в 1 мл розплавленої 1,2% Sea-Plaque™ агарози, охолодженої до 40ºC, та переносили на чашки Петрі діаметром 3,5 см. Після затвердіння агарози додавали 1 мл культурального середовище до чашки Петрі та чашки інкубували при 25ºC у темряві протягом 1 тижня. Диски агарози переносили у чашку Петрі діаметром 20 см, що містить 10 мл культурального середовища, та інкубували при 25ºC у темряві на шюттель-апараті з обертанням при 90 об./хв. Кожні 14 днів замінювали культуральне середовище свіжим середовищем. Ділення клітин протопалстів типово спостерігали через 3 дні після їх перенесення на агарозу, при цьому грудки клітин ставали видимими через 7 днів.

Базисну толерантність лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH до Імазамоксу® визначали шляхом інкубації культур на основі гранул агарози у середовищі з доданням 0, 50, 100, 200, 400 та 600 нМ Імазамоксу® та оцінки показника росту калусів через 2 тижні. Концентрації Імазамоксу®, які є вищими за 200 нМ, блокували розвиток калусів, що свідчить про те, що концентрації 200 нМ та вище є оптимальними для збагачення та селекції клітин пшениці, що мають AHAS (S653N) мутацію.

Одержували встановлені умови селекції для отримання трансгенних рослин з донорним інтегрованим фрагментом, що має S653N мутацію у межах локуса AHAS. Редаговані події рослини використовували для одержання матеріалу експлантатів (наприклад, протопластів або щитків незрілих зиготичних зародків) для другого циклу трансфекції. Як описується у наступному прикладі, матеріал експлантатів послідовно піддавали котрансфекції при використанні донорної молекули ДНК та плазміди, яка кодує ZFN та яка була сконструйована для націлювання сайту зв'язування "цинкових пальців", що розміщений в AHAS генах вище від ділянки, яка кодує P197 амінокислотний залишок.

Приклад 12: Альтернативні системи трансформації для послідовного, вільного від екзогенного маркера стекінгу трансгенів у локусах ендогенного AHAS у пшениці

Молекулярне підтвердження, що забезпечується у Прикладі 10, для події di01-9632-1-1 регенерованої рослини пшениці, демонструє технічну доцільність послідовного, вільного від екзогенного маркера стекінгу трансгенів у локусах ендогенного AHAS у пшениці. Уточнення умов селекції при використанні Імазамоксу® або застосування різних систем трансформації дозволяє одержувати рослини пшениці з послідовним стекінгом трансгенів у локусі ендогенного AHAS. Цей приклад описує підходи для досягнення послідовного, вільного від екзогенного маркера стекінгу трансгенів у локусах ендогенного AHAS у пшениці при використанні альтернативних селективних агентів (наприклад, імідазолінону та сульфонілсечовини) та відповідних AHAS мутацій (наприклад, S653N та P197S). При цьому спочатку визначали умови селекції для сульфонілсечовини.

Оптимізація умов хімічної селекції; одержання рослин пшениці онизькокопійної, випадковим чином інтегрованої Т-ДНК при використанні експресійних конструкцій AHAS(P197S)

Бінарний вектор pDAS000164 (SEQ ID NO:289, Фігура 11), що містить AHAS(P197S) експресійну та PAT селективну касети конструювали та поєднували при використанні навичок та методик, які є загально відомими у галузі техніки. AHAS (P197S) експресійна касета складалася з промотора, 5' нетрансльованої ділянки інтрона гена убіквітину (Ubi) із Zea mays

(Toki та ін., (1992) Plant Physiology, 100: 1503-07), після якого розміщувалася кодуюча послідовність (1935 п.о.) гена AHAS з T. aestivum культивару Bobwhite MPB26RH з нуклеотидом 511, мутованим з C на T для індукції амінокислотної заміни з проліну (P) на серин (S). AHAS експресійна касета містила 3' нетрансльовану ділянку (UTR), що включала термінатор транскрипції, сайт поліаднілування для гена нопалінсинтази (nos) з A. tumefaciens pTi15955 (Fraley та ін., (1983) Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 80(15): 4803-4807). Селективна касета включала промотор, 5' нетрансльовану ділянку та інтрон гена актину (Act1) з Oryza sativa (McElroy та ін., (1990) The Plant Cell 2(2): 163-171), після яких розміщувалася синтетична, оптимізована для рослин версія гену фосфінотрицинацетил трансферази (PAT), ізольованого з Streptomyces viridochromogenes, що кодує білок, який надає стійкості до інгібіторів глутамінсинтетази, що включають фосфінотрицин, глюзозинат та біалафос (Wohlleben та ін., (1988) Gene, 70(1): 25-37). Ця касета закінчувалася 3' UTR ділянкою, що включала термінатор транскрипції та сайти поліаденілування з 35s гену вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV) (Chenault та ін., (1993) Plant Physiology, 101 (4): 1395-1396).

Селективну касету синтезували за допомогою комерційного постачальника послуг щодо генетичного синтезу (наприклад, GeneArt, Life Technologies, тощо) та клонували у GATEWAY®-активований бінарний вектор при використанні RfA Gateway касети, що розміщувалася між геном убіквітину (Ubi) з Zea mays та 3' нетрансльованою ділянкою (UTR) та включала термінатор транскрипції та сайт поліаденілування гена синтезу нопалінсинтази (nos) з A. tumefaciens pTi15955. Кодуючу послідовність AHAS (P197S) піддавали ампліфікації при використанні фланкуючих сайтів attB та субклонували у pDONR221. Одержаний ENTRY клон використовували у LR CLONASE II® (Invitrogen, Life Technologies) реакції з Gateway-активованим бінарним вектором, що кодує експресійну касету фосфінотрицин ацетилтрансферази (PAT). Колонії усіх об'єднаних плазмід спочатку піддавали скринінгу шляхом рестрикційного перетравлювання miniprep ДНК. Рестрикційні ендонуклеази одержували від New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA) та Promega (Promega Corporation, WI). Одержання плазмід здійснювали при використанні набору QIAPREP SPIN MINIPREP KIT® (Qiagen, Hilden) або системи PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM® (Promega Corporation, WI) у відповідності з інструкціями постачальників. Плазмідну ДНК відібраних клонів піддавали секвенуванню при використанні ABI секвенування за Сенгером та BIG DYE TERMINATOR V3.1® пропису циклу секвенування (Applied Biosystems, Life Technologies). Дані стосовно послідовності поєднували та піддавали аналізу при використанні програмного забезпечення SEQUENCHER™ (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

Одержаний бінарний експресійний клон pDAS000164 трансформували у штам Agrobacterium tumefaciens EHA105. Одержували трансгенні рослини пшениці з випадковим чином інтегрованою T-ДНК шляхом опосередкованої Agrobacterium трансформації при використанні донорної лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH, у відповідності з прописом, подібним до такого Wu та ін. (2008) Transgenic Research 17: 425-436. Експресійні конструкції путативних T_0 трансгенних подій експресії AHAS (P197) піддавали селекції на толерантність до фосфінотрицину (PPT), фенотип, що забезпечується PAT трансгенним селективним маркером, та переносили у ґрунт. T_0 рослини вирощували в умовах вегетаційної камери та одержували T_1 насіння.

Геномну ДНК з кожної T_0 рослини екстрагували з тканини листя при використанні прописів, як описано раніше у Прикладі 6, та піддавали аналізу на присутність або на відсутність залишків штаму Agrobacterium tumefaciens та на кількість інтегрованих копій T-ДНК, що кодує AHAS (P197S). Присутність або відсутність штаму A. tumefaciens визначали при використанні аналізу кількісної ПЛР на основі дуплексного гідролітичного зонду (аналогічний до TAQMAN™) для ампліфікації ендогенного гена убіквітину (SEQ ID NO:290, SEQ ID NO:291 та SEQ ID NO:292 для прямого та зворотного праймерів та послідовності зонда, відповідно) з геному пшениці, та virC з pTiBo542 (SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO:294 та SEQ ID NO:70 для прямого та зворотного праймерів та послідовності зонда, відповідно). Кількість інтегрованих копій T-ДНК оцінювали при використанні аналізу кількісної ПЛР на основі дуплексного гідролітичного зонду, як описано раніше у Прикладі 6, на основі гена пуроіндоліну b (Pinb) з D геному гексаплоїдної пшениці та ділянки промотора актину (Act1), що є присутньою у pDAS000164. Загалом, одержували 35 незалежних T_0 події з меншою, ніж три випадковим чином інтегровані копії, кількістю T-ДНК.

Оптимізація умов хімічної селекції; умови для регенерації рослин пшениці на сульфометурон метилі

Проводили серії експериментів для визначення оптимальних умов селекції для регенерації рослин пшениці, що експресують AHAS (P197S) мутацію, яка надає стійкості до гербіцидів класу сульфонілсечовин. Ці експерименти базувалися на аналізі базисної толерантності донора

дикого типу лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH (P197/P197генотип, який забезпечує чутливість до сульфонілсечовини) на етапах індукції калусів, регенерації рослин та етапі укорінення створеної системи трансформації пшениці. Подібні експерименти проводили для визначення базисної толерантності подій трансгенного культивару Bobwhite MPB26RH, який мав випадковим чином інтегровану Т-ДНК, що експресує AHAS (P197S) мутацію, що надає толерантності до селективних агентів на основі сульфонілсечовини.

Базисну толерантність донора дикого типу лінії пшениці до сульфометурон метилу на стадії індукції калусів визначали так, яка описано нижче: ізолювали щитки незрілих зиготних зародків, як було описано раніше у Прикладі 4, та висаджували їх на чашки Петрі діаметром 10 см, що містили CIM середовище з доданням 0, 100, 500, 1000, 1500 та 2000 нМ сульфометурон метилу, відповідно. Двадцять щитків висаджували на кожну чашку Петрі. Загалом, піддавали аналізу загальну кількість 60 щитків для кожної концентрації сульфометурон метилу. Після інкубації при 24°C у темряві протягом 4 тижнів реєстрували кількість утворених соматичних ембріогенних калусів (SEC) при кожній концентрації сульфометурон метилу. Результати показали, що утворення SEC для культивару Bobwhite MPB26RH знижувалося приблизно на 70% при концентрації сульфометурон метилу 100 нМ, у порівнянні із необробленими зразками.

Базисну толерантність донора дикого типу лінії пшениці до сульфометурон метилу на стадії регенерації рослин визначали так, як описано нижче: щитки незрілих зиготних зародків з донорної лінії пшениці ізолювали та поміщали на чашки Петрі діаметром 10 см, що містили CIM середовище. Потім утворення SEC здійснювали шляхом інкубації при температурі 24°C у темряві протягом 4 тижнів. SEC переносили на чашки Петрі діаметром 10 см, що містили DRM середовище з доданням 0, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 та 3000 нМ сульфометурон метилу, відповідно. Двадцять CIM висаджували у кожну чашку Петрі. Загалом 60 CIM піддавали аналізу на відповідь базисної толерантності при кожній концентрації сульфометурон метилу. Після інкубації протягом 2 тижнів при температурі 24°C в умовах фотоперіоду 16/8 годин (світло/темрява) у вегетаційній камері, реєстрували регенерацію. Результати показали, що регенерація рослин знижувалася приблизно на 80% при концентрації сульфометурон метилу 2000 нМ, у порівнянні із необробленими зразками.

Базисну толерантність донора дикого типу лінії пшениці до сульфометурон метилу на стадії утворення коренів визначали так, як описано нижче: щитки незрілих зиготних зародків ізолювали та поміщали у чашки Петрі діаметром 10 см, що містили CIM середовище. Потім SEC залишали для подальшого розвитку шляхом інкубації при температурі 24°C у темряві протягом 4 тижнів. SEC переносили у чашки Петрі діаметром 10 см, що містили DRM середовище, та інкубували протягом 2 тижнів при 24°C в умовах фотоперіоду 16/8 годин (світло/темрява) для того, щоб дозволити провести регенерацію. Регенеровані рослини переносили на чашки Петрі діаметром 10 см, що містили RM середовище з доданням 0, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 1000 та 2000 нМ сульфометурон метилу, відповідно. Десять регенерованих рослин висаджували у кожну чашку Петрі. Загальну кількість 30 регенерованих рослин піддавали аналізу на відповідь базисної толерантності при кожній концентрації сульфометурон метилу. Після інкубації протягом 3 тижнів при температурі 24°C в умовах фотоперіоду 16/8 годин (світло/темрява) у вегетаційній камері реєстрували утворення коренів. Результати показали, що утворення кореневої системи піддавалося жорсткому інгібуванню тоді, коли концентрації сульфометурон метилу були вищими за 400 нМ, у порівнянні із необробленими зразками.

Базисну толерантність до сульфометурон метилу подій у трансгенній пшениці з довільним чином інтегрованою низькокопійною Т-ДНК (≤ 3), що експресує AHAS (P197S) мутацію з pDAS000164, на стадії утворення коренів визначали так, як описано нижче: чотири незалежні трансгенні події довільним чином відбирали та розмножували in vitro шляхом субкультивування на середовищі для розмноження. Після розмноження рослини для кожної події переносили на чашки Петрі діаметром 10 см, що містили RM середовище з доданням 0, 400, 450, 500, 550 та 600 нМ сульфометурон метилу, відповідно. Чотири рослини (одна з кожної з чотирьох подій) висаджували у кожну чашку Петрі. Загалом 3 рослини на подію піддавали аналізу на базисну толерантність при кожній концентрації сульфометурон метилу. Після інкубації протягом 2 тижнів при 24°C в умовах фотоперіоду 16/8 годин (світло/темрява) у вегетаційній камері, реєстрували утворення коренів. Результати показали, що утворення кореневої системи не було обмеженим, у порівнянні із необробленими контролями, при будь-якій концентрації, яку піддавали аналізу, що свідчило про те, що AHAS(P197S) мутація надавала високої толерантності до сульфометурон метилу.

Конструювання та синтез донорної ДНК для першого послідовного стекінгу трансгенів у локусі ендогенного AHAS при використанні NHEJ-направленого відновлення ДНК

Конструювали конструкцію донорної ДНК pDAS000433 (Фігура 12) для першого циклу

стекінгу трансгенів та синтезували так, як описано у Прикладах 10 та 11 для того, щоб сприяти точній інтеграції донора (що містить S653N мутацію) у локус ендогенного AHAS при використанні опосередкованого ZFN, NHEJ-направленого відновлення. Одержували цільні рослини, що є резистентними до Імазамоксу®, та готували їх до другого циклу націлювання для введення.

Конструювання та синтез донорної ДНК для другого послідовного стекінгу трансгенів у локусі ендогенного AHAS при використанні NHEJ-направленого відновлення ДНК

Донорну ДНК (pDAS000434; Фігура 13; SEQ ID NO:72), що містить P197S мутацію, для другого циклу стекінгу трансгенів конструювали для того, щоб сприяти точній інтеграції донора у той самий локус AHAS, що являв собою мішень у першому стекінгу трансгенів, при використанні опосередкованого ZFN, NHEJ-направленого відновлення. Конструкція базувалася на інтеграції дволанцюгової молекули донора у розрив дволанцюгової ДНК, створений при використанні розщеплення копії гена AHAS, що містить перший вбудований трансген при використанні ZFN 34480 та 34481 (що кодуються плазмідою pDAB111860) або ZFN 34482 та 34483 (що кодуються плазмідою pDAB111861). pDAS000434 донорна молекула включає декілька частин полінуклеотидних послідовностей. 5' кінці містять послідовність, яка є майже ідентичною до ендогенного гена AHAS, що кодується у D-геномі, починаючи від цільового сайту розщеплення ZFN та закінчуючи стоп-кодоном AHAS. Вводили декілька ненавмисних мутацій у цю послідовність: мутації, що кодують P197S мутацію та оптимізовані за кодонами, синонімічні мутації, які розміщуються у різних місцях сайту зв'язування ZFN 34481 та 34483 для запобігання повторного розщеплення інтегрованого донора. За стоп-кодоном розміщувалася некодуюча послідовність довжиною 316 п.о., що відповідає консервативній 3' нетрансльованій ділянці (3'UTR) у гомологах AHAS. Після послідовності 3' нетрансльованої ділянки йшли сайти зв'язування "цинкових пальців" для ZFN 34474 та 34475 (що кодуються плазмідою pDAB111857) та ZFN 34476 та 34477 (що кодуються плазмідою pDAB111858). Ці сайти зв'язування "цинкових пальців" дозволяли здійснювати самостійне вирізування послідовності AHAS (кодуюча ділянка та 3'UTR), що походить від донора, яка піддавали інтеграції в ендогенний локус на етапі наступного циклу стекінгу трансгенів. Після здатних до самостійного вирізування сайтів зв'язування "цинкових пальців" йшли декілька сайтів зв'язування "цинкових пальців" (кожний з яких був відокремлений при використанні випадкової послідовності довжиною 100 п.о.), що фланкують унікальні сайти розщеплення для рестрикційної ендонуклеази та які дозволяють проводити інсерцію експресійної касети трансгена (наприклад, експресійної касети DGT-28, як описується у публікації патентної заявки США № 20130205440). Додаткові сайти зв'язування "цинкових пальців" дозвляють здійснювати майбутнє вирізування трансгенів, що можуть бути інтегровані у локус AHAS шляхом послідовного стекінгу трансгенів за відсутності маркера, або шляхом постійного послідовного стекінгу трансгенів у тому самому положенні у геномі при використанні альтернативного способу стекінгу. Донорну касету синтезують за допомогою комерційного постачальника послуг у генетиці (наприклад, GeneArt, Life Sciences) при використанні додаткових фланкуючих послідовностей на 5' та 3' кінцях, що мають коротку довжину, для того, щоб дозволити провести одержання донорної молекули з виступаючими 5' та 3' кінцями, які є сумісними з виступаючими кінцями для лігування, що утворені за допомогою ZFN 34474 та 34475 (що кодуються плазмідою pDAB111857) або ZFN 34476 та 34477 (що кодуються плазмідою pDAB111858), при розщепленні локусу ендогенного AHAS.

Донорну молекулу з виступаючими 5' та 3' кінцями одержували шляхом перетравлювання плазмідної ДНК, що містить донорну молекулу, або після ПЛР ампліфікації, як описується для "QA_pDAS000434" та/або pDAS000433, за допомогою рестрикційної ендонуклеази BbsI при використанні стандартних способів, які є відомими у даній галузі техніки.

Система трансформації для вільного від маркера послідовного стекінгу трансгенів у локусі ендогенного AHAS у пшениці при використанні NHEJ-направленого відновлення ДНК

Події у трансгенній пшениці з множинними трансгенами, інтегрованими у той самий локус ендогенного AHAS, одержували шляхом вільного від екзогенного маркера послідовного стекінгу трансгенів при використанні трансформації за допомогою донора pDAS000433 та ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350). Точна опосередкована ZFN, NHEJ-направлена інтеграції донора вводить перший трансген та S653N мутацію, що надає стійкості до імідазолінонів, у локус AHAS, дозволяючи при цьому здійснювати регенерацію правильно націлених рослин при використанні Імазамоксу® як агента для селекції, як описано раніше у Прикладі 5. Фігура 14a відображує цю інтеграцію. Послідовна трансформація рослин пшениці, що мають походження від перших подій, пов'язаних з інтегрованим трансгеном, при використанні донора pDAS000434 та ZFN 34480 та 34481 (що кодуються плазмідою pDAB111860) приводить до заміщення ендогенного хроматину, розташованого між ZFN сайтами

зв'язування, що розміщуються вище від P197 та у сайті самостійного вирізання, інтегрованого під час першої інтеграції трансгена за допомогою донорної молекули. Це приводить до інтеграції другого трансгена та P197S мутації, що надає стійкості до сульфонілсечовини, дозволяючи при цьому здійснювати регенерацію правильно націлених рослин при використанні сульфометурон метилу як агента для селекції. У той самий час інтеграція другого донора видаляє S653N мутацію, відновлюючи, таким чином, чутливість до імідазолінонів (Фігура 14b). Кваліфікований спеціаліст у даній галузі техніки зможе оцінити, що стекінг третього трансгену може бути досягнутий шляхом трансформації при використанні прийнятних нуклеаз "цинкових пальців" та донора, що містить додатковий трансген та надає чутливості до сульфонілсечовини та толерантності до імідазолінонів, дозволяючи, таким чином, здійснювати регенерацію правильно націлених рослин при використанні Імазамоксу® як агента для селекції. Як такі безперервні цикли послідовного стекінгу трансгенів є можливими при використанні трансформації за допомогою донорів, які вводять трансгени та мутації в ендогенні гени AHAS, для диференційного повторювання циклів між селективними агентами на основі імідазолінону та сульфонілсечовини.

Система трансформації, що використовується для регенерації рослин пшениці із трансгенами, які є послідовно інтегрованими у локус ендогенного AHAS, базується на описаному раніше підході для біолістично опосередкованої доставки ДНК до щитків незрілих зиготних зародків пшениці, або безпосередню доставку ДНК до протопластів пшениці при використанні підходів, які є відомими кваліфікованому спеціалісту у даній галузі техніки; наприклад, при використанні способу He та ін. (1994) Plant Cell Reports 14: 92-196, або інших способів, які описані у Прикладі 11.

Конструювання та синтез донорної ДНК для першого послідовного стекінгу трансгенів у локусі ендогенного AHAS при використанні HDR-направленого відновлення ДНК

Донорну ДНК для першого циклу стекінгу трансгенів конструювали для того, щоб сприяти точній інтеграції донора у локусі ендогенного AHAS при використанні опосередкованого ZFN, HDR-направленого гомологічного відновлення. Конструкція базується на інтеграції дволанцюгової молекули донора у положенні розриву дволанцюгової ДНК, створеного при використанні розщеплення гомологічної копії ендогенного гена AHAS при використанні ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350). Донорна молекула (pDAS000435; Фігура 16; SEQ ID NO:295) є ідентичною за послідовністю до pDAS000433 (Фігура 12).

Донорну касету синтезували за допомогою комерційного постачальника генетичних послуг (наприклад, GeneArt, Life Sciences, тощо) при використанні 750 п.о. гомологічних плечей на кожному кінці. Гомологічні плечі на 5' та 3' кінцях донора відповідають послідовності ендогенного AHAS безпосередньо вище та нижче від розриву подвійного ланцюга ДНК, створеного при використанні ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350).

Конструювання та синтез донорної ДНК для другого послідовного стекінгу трансгенів у локусі ендогенного AHAS при використанні HDR-направленого відновлення ДНК

Донорну ДНК для другого циклу стекінгу трансгенів конструювали для того, щоб сприяти точній інтеграції донора у тому самому локусі AHAS, що являв собою мішень при першій інтеграції трансгенів при використанні опосередкованого ZFN, HDR-направленого гомологічного відновлення. Конструкція базувалася на інтеграції дволанцюгової молекули донора у розриві дволанцюгової ДНК, створеному за допомогою розщеплення копії гена AHAS, що містить перший інтегрований трансген, при використанні ZFN 34480 та 34481 (що кодуються плазмідою pDAB111860) або ZFN 34482 та 34483 (що кодуються плазмідою pDAB111861). Донорна молекула (pDAS000436; Фігура 17; SEQ ID NO:296) є ідентичною за послідовністю до pDAS000434 (Фігура 13).

Донорну касету синтезували за допомогою комерційного постачальника генетичних послуг (наприклад, GeneArt, Life Sciences, тощо) при використанні 750 п.о. гомологічних плечей на кожному кінці. Гомологічне плече на 5' кінці донора відповідає послідовності ендогенного AHAS безпосередньо вище та нижче від розриву подвійного ланцюга ДНК, створеного при використанні ZFN 34480 та 34481 (що кодуються плазмідою pDAB111860). Гомологічне плече на 3' кінці донора відповідає послідовності GOI-1, яка межує з розривом дволанцюгової ДНК, створеним при використанні ZFN 34480 та 34481 у донорній ДНК, інтегрованій у перший стек трансгенів.

Система трансформації для екзогенного, вільного від маркера послідовного стекінгу трансгенів у локусі ендогенного AHAS у пшениці при використанні HDR-направленого відновлення ДНК

Трансгенні події у пшениці з множинними трансгенами, інтегрованими у тому самому локусі ендогенного гена AHAS, одержували шляхом екзогенного, вільного від трансгенного маркера

послідовного стекінгу трансгенів, які кодують ознаки (за відсутності застосування трансгенного маркера) при використанні трансформації за допомогою донора pDAS000435 та ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350). Точна опосередкована ZFN, HDR-направлена інтеграція донора вводила перший трансген та S653N мутацію, що надає стійкості до імідазолінонів у тому самому локусі AHAS, дозволяючи, такими чином, проводити регенерацію правильно націлених рослин при використанні Імазамоксу® як агенту для селекції, як було описано раніше у Прикладі 5. Фігура 15a показує таку інтеграцію. Подальша трансформація рослин пшениці, що мають походження від подій першого стекінгу трансгенів при використанні донора pDAS000436 та ZFN 34480 та 34481 (що кодуються плазмідою pDAB111860), приводила до заміщення ендогенного хроматину, який розміщується між сайтами зв'язування ZFN, які розташовані вище від P197 та у сайті самостійного вирізання, інтегрованого під час першої інтеграції при використанні донорної молекули. Це приводило до інтеграції другого трансгена та P197S мутації, що надає стійкості до сульфонілсечовини. У відповідності із цим інтеграція другого трансгена дозволяла проводити регенерацію правильно націлених рослин при використанні сульфометурон метилу як агента для селекції. У той самий час інтеграція другого донора видаляла S653N мутацію, відновлюючи, таким чином, чутливість до імідазолінонів (Фігура 15b). Як буде очевидним для кваліфікованого спеціаліста у даній галузі техніки, стекінг третього трансгену може бути досягнутий шляхом трансформації при використанні прийнятної нуклеази "цинкових пальців" та донора, що містить додатковий трансген та надає чутливості до сульфонілсечовини та толерантності до імідазолінонів, дозволяючи, таким чином, здійснювати регенерацію правильно націлених рослин при використанні Імазамоксу® як агента для селекції. Як такі безперервні цикли послідовного стекінгу трансгенів є можливими при використанні трансформації за допомогою донорів, які вводять трансгени та мутації в ендогенні гени AHAS, для диференційного повторювання циклів між селективними агентами на основі імідазолінону та сульфонілсечовини.

Система трансформації, що використовується для регенерації рослин пшениці з послідовно інтегрованими трансгенів у локусі ендогенного AHAS, базується на описаному раніше підході для біолістично опосередкованої доставки ДНК до щитків незрілих зиготних зародків пшениці або на безпосередній доставці ДНК до протопластів пшениці при використанні підходів, які є відомими кваліфікованому спеціалісту у даній галузі техніки; наприклад, при використанні способу He та ін. (1994) Plant Cell Reports 14: 92-196, або інших способів, які описані у Прикладі 11.

Приклад 13: Розробка системи трансформації для редагування геному за відсутності екзогенного маркера у локусі не здатної до селекції ознаки у пшениці

Точність геномної модифікації ендогенних локусів забезпечує ефективний підхід для модифікації експресії ознак. Одержання подій трансформації за відсутності екзогенного маркера з точними геномними модифікаціями в одному або більше локусів не здатної до селекції ендогенної ознаки забезпечує можливості для створення нових алелів та нових особливо важливих алелів для удосконалення культури. У даній заявці ми описуємо розробку системи трансформації для опосередкованого ZFN, вільного від екзогенного маркера точного редагування геному у локусах не здатної до селекції ознаки у пшениці, що може бути адаптована як для інтегративної, так і не інтегративної модифікації ознаки.

Система трансформації базується на двохетапному процесі. На першому етапі опосередкована ZFN точна геномна модифікація використовується для того, щоб одночасно модифікувати два незалежні локуси у геномі рослин; один локус є модифікованим для надання толерантності до селективного маркера, другий є модифікованим для зміни експресії не здатної до селекції ознаки, яка представляє інтерес. Трансформацію T_0 подій, які сумісно піддаються редагуванню в обох локусах, здійснюють шляхом селекції на введений екзогенний селективний маркер. На другому етапі вільні від маркера події тільки з модифікованим локусом ознаки відновлюють за допомогою ПЛР скринінгу розщеплених T_1 рослин. Підхід може бути адаптований для неінтегративної точної модифікації генома, що приводить або до деструкції не здатного до селекції ендогенного гена, або до перетворення (редагування) нуклеотидної послідовності не здатного до селекції ендогенного гена. Альтернативно, підхід може бути адаптований для інтегративної точної модифікації геному, в якому функція не здатного до селекції ендогенного гена є зміненою. У загальному випадку, цей підхід може бути адаптований для неінтегративної точної модифікації геному, з якого інтегрована раніше екзогенна ДНК, наприклад, трансген, була вирізана.

Ендогенний ген AHAS у пшениці був вибраний як модельний локус для встановлення та створення системи трансформації для точного редагування геному у локусі не здатної до селекції ознаки у пшениці за відсутності екзогенного маркера.

Одержання донорної ДНК для опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування гена AHAS

Молекулу донорної ДНК, pDAS000267 (SEQ ID NO:84 та SEQ ID NO:85), конструювали та синтезували так, як описано у Прикладі 6. Стисло, донорна ДНК складалася з дволанцюгової молекули розміром 95 п.о., яку конструювали для інтеграції у положенні розриву дволанцюгової ДНК, створеного при використанні розщеплення гомологічної копії ендогенного гена AHAS за допомогою ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB109350). Конструкція pDAS000267 складалася з двох частин. 5' кінці включали послідовність, що є майже ідентичною до ендогенного гена AHAS, що є закодованим у D-геномі, починаючи від сайту-мішені для розщеплення ZFN та закінчуючи стоп-кодоном AHAS. Шість навмисних мутацій вводили у цю послідовність: дві мутації, що кодуються S653N мутацією (AGC→AAT), та чотири синонімічні мутації (в яких мовчазна мутація була введена у донорну послідовність). 3' кінці донорної молекули містили унікальну послідовність, що може використовуватися для діагностичної ПЛР для визначення опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування подій у гені. Донорну молекулу конструювали з виступаючими 5' та 3' кінцями для забезпечення лігування виступаючих кінців для того, щоб сприяти опосередкованому ZFN NHEJ-направленому відновленню ДНК.

Одержання ДНК конструкцій ZFN

Плазмідну ДНК для pDAB109350 (Фігура 1), що кодує ZFN29732 та 29730 одержували з культур E. coli при використанні системи PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM® (Promega Corporation, Madison, WI) у відповідності з інструкціями виробника.

Конструювання та одержання бінарного вектора, що кодує PAT селективну касету

Стандартні способи клонування використовували для конструювання бінарного вектора pDAS000004 (SEQ ID:303; Фігура 18). PAT селективна касета складалася з промотора, 5' нетранслюваної ділянки та інтрона гена актину (Act1) з Oryza sativa (McElroy та ін., (1990) The Plant Cell 2(2): 163-171), після якого розміщувалася синтетична, оптимізована для рослин версія гена фосфінотрицин ацетилтрансферази (PAT), ізольованого зі Streptomyces viridochromogenes, що кодує білок, який надає резистентності до інгібіторів глутамінсинтази, які включають фосфінотрицин, глюфозинат та біалафос (Wohlleben та ін., (1988) Gene, 70(1): 25-37). Ця касета закінчувалася 3'UTR, що включав термінатор транскрипції та сайти поліаденілування з 35s гену вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV) (Chenault та ін., (1993) Plant Physiology 101 (4): 1395-1396).

Селективна касета була синтезована комерційним постачальником генетичних послуг (GeneArt, Life Technologies, etc.) та клонована у Gateway-активований бінарний вектор. Колонії поєднаної плазміди піддавали скринінгу шляхом рестрикційного перетравлювання miniprep ДНК при використанні рестрикційної ендонуклеази, одержаної від New England BioLabs та Promega. Одержання плазмід проводили при використанні набору QIAPREP SPIN MINIPREP KIT™ у відповідності з інструкціями виробника. ПлазміднуДНК відібраних клонів піддавали секвенуванню при використанні ABI секвенування за Сенгером та пропису циклічного секвенування BIG DYE TERMINATOR v3.1™ (Applied Biosystems, Life Technologies). Дані стосовно послідовності поєднували та аналізували при використанні програмного забезпечення SEQUENCHER™ (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Плазмідну ДНК, що використовувалася для трансфекції, одержували з культур E. coli при використанні системи PURE YIELD PLASMID MAXIPREP SYSTEM® (Promega Corporation, Madison, WI) у відповідності з інструкціями виробника.

Біолістично опосередкована система трансформації для одержання рослин пшениці з точними модифікаціями генома у локусах нездатних до селекції ендогенних ознак за відсутності екзогенного маркера

Загалом одержували 2320 щитків незрілих зиготних зародків з донорної лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH для біолістичної доставки ДНК так, як було описано раніше. Вкриті ДНК частинки золота одержували так, як описувалося вище при використанні суміші ДНК, що включає 2,5 мкг донорної pDAS000267 та плазміди pDAB109350 (при молярному співвідношенні 7:1, відповідно) та 2,5 мкг плазміди pDAS000004.

Після бомбардування трансфіковані щитки інкубували при 26°C у темряві протягом 16 годин перед перенесенням на середовище для індукції калусів. Щитки культивували у темряві на середовищі для індукції калусів при 24°C протягом 2 тижнів. Одержані калуси піддавали субкультивуванню один раз на свіжому середовищі для індукції калусів та підтримували у тих самих умовах протягом додаткових 2 тижнів. SEC переносили на середовище для індукції калусів, що містить 5 мг/мл Баста®, та культивували протягом 2 тижнів при температурі 24°C в умовах фотоперіоду 16/8 годин (світло/темрява) у вегетаційній камері. Регенеровані проростки

переносили на середовище для укорінення, що містило 5 мг/мл Баста®, та культивували за тих самих умов протягом 2-3 тижнів. Регенеровані проростки, що утворювали корені, передбачалися як такі, що містять одну або більше копій PAT селективної касети, що є випадковим чином вбудованою у геном рослини. Корені цих проростків видаляли, та рослини знову піддавали субкультивуванню на середовищі для укорінення, що містить 200 нМ Імазамоксу®, за тих самих умов протягом 2-3 тижнів. Рослини з повторно утвореними коренями передбачалися як такі, що містять S653N мутацію (що походить від точної інтеграції pDAS000267) в одну або більше копій ендогенного гена AHAS.

Одержували загалом 170 рослин пшениці, які забезпечували сильний ріст кореневої системи на середовищі для укорінення, що містить Баста®, в результаті трансфекції 2320 щитків незрілих зиготних зародків з донорної лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH. 3 них дві рослини пшениці забезпечували одержання коренів при перенесенні на середовище для укорінення, що містить Імазамокс®. Ці рослини переносили у ґрунт та вирощували в умовах вегетаційної камери для одержання T_1 насіння.

Оптимізація хімічної селекції при використанні Баста® для збагачення на події трансформації у системі трансформації на основі протопластів пшениці

Проводили серію експериментів для визначення оптимальних умов селекції для регенерації рослин пшениці, що експресують PAT ген, який надає стійкості до Баста®, при використанні системи трансформації на основі протопластів, так, як описано Qiao та ін. (1992) Plant Cell Reports 11: 262-265; Ahmed та Sagi (1993) Plant Cell Reports 12:175-179; Pauk та ін. (1994) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 38: 1-10; He та ін. (1994) Plant Cell Reports 14: 92-196; Gu та Lang (1997) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50: 139–145; and Li та ін. (1999) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58: 119–125.

Умови селекції на основі Баста® оптимізували при використанні протопластів, що мають походження від суспензійної культури клітин соматичних ембріогенних калусів (SEC) лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH. У той час як протопласти, що мали походження від Bobwhite MPB26RH не є тотипотентними (тобто не можуть використовуватися для регенерації цільних рослин), умови селекції, розроблені для збагачення на події, які експресують PAT ген, очікувалися як такі, що можуть бути перенесені на будь-яку систему трансформації на основі протопластів, яка базується на тотипотентному генотипі пшениці. Проводили експерименти та встановлювали базисну толерантність донора дикого типу лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH до Баста®. Було визначено, що застосування умов селекції на основі Баста® є більш сильним, ніж базисна толерантність, та їх використовували для селекції трансформованих клітин, які експресують PAT ген.

Створення культур на основі гранул агарози та умови селекції при використанні Баста®

Протопласти ізолювали зі створених суспензійних культур клітин, що походять від SEC, та використовували їх для одержання культур на основі гранул агарози, як було описано раніше. Базисну толерантність лінії пшениці культивару Bobwhite MPB26RH до Баста® визначали шляхом інкубації культур на основі гранул агарози у середовищі з доданням 0, 0,5, 2,5, 5, 7,5, 10, 20, 30, 40 та 50 мг/л Баста® та оцінювали швидкість росту калусів через 2 тижні. Концентрації Баста® (наприклад, вищі за 20 мг/л), які жорстко блокували розвиток калусів, є оптимальними для збагачення та селекції клітин пшениці, що мають PAT ген.

Молекулярна характеристика трансформованих рослин пшениці з фенотипами толерантності до Баста® та Імазамоксу®

Дві рослини пшениці, які мають фенотипи толерантності до гербіцидів Баста® та Імазамокс® піддавали молекулярній характеристиці для ідентифікації ендогенного гена AHAS, що містить S653N мутацію, що виникає в результаті інтеграції pDAS000267 донора у сайт подвійного розриву геному, створеного при використанні ZFN 29732 та 29730, що кодуються pDAB109350.

Проводили два молекулярні аналізи для кожної рослини пшениці при використанні геномної ДНК, екстрагованої при використанні набору DNEASY® PLANT DNA EXTRACTION MINI KIT™ (Qiagen) із замороженої висушуванням тканини листя, як було описано раніше.

Перший молекулярний аналіз використовували для підтвердження того, що рослини пшениці мають принаймні одну довільним чином інтегровану копію PAT гена. Аналіз кількісної ПЛР на основі дуплексного гідролізу зонду (аналогічний до TAQMAN®) використовували для ампліфікації одиничної копії ендогенного гена, гена пуроіндоліну-b (Pinb), з D-геному гексаплоїдної рослини пшениці (Gautier та ін., (2000) Plant Science 153, 81–91; SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90 та SEQ ID NO: 91 для послідовностей прямого праймера, зворотного праймера та зонду, відповідно) та ділянки промотора актину (Act1), що є присутньою у pDAS000004 (SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93 та SEQ ID NO: 94 для послідовностей прямого праймера, зворотного

праймера та зонду, відповідно). Оцінку присутності та кількості копій pDAS000004 здійснювали у відповідності зі способом, описаним у Livak та Schmittgen (2001) Methods 25(4):402-8. З цих результатів одержували підтвердження для інтеграційних подій yc06-9110-1 та yr00-9311-1, відповідно, полінуклеотидної послідовності PAT у геном рослин пшениці.

Другий молекулярний аналіз використовували для характеристики субгеномної локалізації та виходу для опосередкованої ZFN NHEJ-направленої інтеграції донора в ендогенних генах AHAS. ПЛР при використанні праймерів AHASs653ZFN.F2 та AHASs653ZFN.R1 (SEQ ID NO: 301 та 302; Таблиця 18) використовували для ампліфікації ДНК фрагменту з кожної з трьох гомологічних копій ендогенного гена AHAS. Ампліфікований фрагмент включав ділянку, що містить сайт зв'язування для ZFN 29732 та 29730 (що кодуються плазмідою pDAB190350), та для включення варіації геномної нуклеотидної послідовності. Достатню варіацію геномної нуклеотидної послідовності включали для диференціації між AHAS гомологами, так, що одержані амплікони могли бути однозначно приписані (на рівні послідовності) до субгеному пшениці, з якого вони походять. Одержані амплікони одержували для глибокого секвенування, як описується у Прикладі 12, та піддавали секвенуванню на приладі Illumina MiSEQ™ для одержання послідовностей фрагментів довжиною 250 п.о. зі спареними кінцями у відповідності з інструкціями виробника. Одержані послідовності фрагментів піддавали комп'ютерній обробці так, як було описано раніше, для приписування кожного фрагмента зразку (на основі штрихового коду) та субгеному, з якого вони походять (на основі нуклеотидної варіації, що розрізняє гомологічні копії гена AHAS). Як описується у Прикладі 9, інтеграція pDAS000267 у локус ендогенного гена AHAS приводила до одержання відмінності розміром у 95 п.о. між алелем дикого типу (немодифікованим) та одержаними трансгенним (модифікованим) алелем. Таким чином, очікувалася ПЛР ампліфікація локусів як гена AHAS дикого типу, так і модифікованого. Розроблені покупцем прописи PERL та ручну обробку даних у MICROSOFT EXCEL 2010™ (Microsoft Corporation) використовували для характеристики субгеномної локалізації та виходу стосовно інтеграції донора в ендогенні гени AHAS.

З результатів другого молекулярного аналізу було продемонстровано вичерпне підтвердження точного опосередкованого ZFN NHEJ-направленого редагування гену у локусі ендогенного AHAS для обох рослин пшениці. Подія yc06-9110-1 мала точну гемізиготну інтеграцію донора у B-геном (Таблиця 24). Подія yr00-9311-1 мала одночасну інтеграцію донора у множинні субгеноми. У A-геномі спостерігали незалежне редагування обох локусів ендогенного гена AHAS. Один алель мав часткову інтеграцію донора, що приводило до очікуваної інтеграції S653N мутації для експресії фенотипу толерантності до AHAS гербіцидів. Проте були делетовані нуклеотиди з фрагменту, що охоплював 24 п.о., на 3' кінці донорної молекули. Інший алель мав інтеграцію полінуклеотидної послідовності розміром 51 п.о. невідомого походження. Не було одержано ніяких фрагментів послідовності, які походили від B-геному, що дає змогу говорити про незалежну інтеграцію великої полінуклеотидної послідовності у кожний з локусів ендогенного AHAS (Таблиця 24). Консенсусні послідовності для алелей, що були присутніми у кожному субгеномі для двох регенерованих рослин пшениці, забезпечуються як SEQ ID NO: 304-313. Відсутність підтвердження послідовності, що має походження від pDAS0000004, в обох подіях у рослинах пшениці свідчить про те, що PAT ген, який надає стійкості до Баста®, був довільним чином інтегрований у відмінний локус геному рослини.

Таблиця 24

Опосередковане ZFN NHEJ-направлене AHAS результатів редагування для рослин пшениці yc06-9110-1 та yr00-9311-1

		A-геном		B-геном		D-геном		
		Алель 1	Алель 2	Алель 1	Алель 2	Алель 1	Алель 2	SEQ ID NO:
yc06-9110-1	Статус	UE	UE	PE	UE	UE	UE	304-309
	Кільк. фрагм.[1]	143159		76903	110846	219858		
yr00-9311-1	Стус	IE	IE	н/в	н/в	UE	UE	310-313
	Кільк. фрагм.[11]	164038	138539	0		556123		

[1]Кількість фрагментів послідовності, які походять від специфічного субгеному та які мають

послідовність гаплотипу, що відповідає AHAS локусам дикого типу (немодифікованим) або трансгенним (модифікованим).
“PE” означає правильне редагування; тобто опосередковане ZFN NHEJ-направлене редагування геному, що забезпечує прогнозований результат.
“IE” означає неправильне редагування; тобто опосередковане ZFN NHEJ-направлене редагування геному, що забезпечує неочікуваний результат.
“UE” означає нередагований алель; тобто алель має послідовність дикого типу.
“н/в” не визначали.

Ці результати вперше розкривають спосіб трансформації, який може використовуватися для одержання рослин пшениці, які мають точну геномну модифікацію у локусах однієї або більше нездатних до селекції ознак, за відсутності екзогенного маркера. Є представленими рослини пшениці, що включають інтегрований донорний полінуклеотид AHAS, який кодує S653N мутацію, що надає стійкості до гербіцидів класу імідазолінонів. Як буде зрозумілим кваліфікованому спеціалісту у даній галузі техніки, рослини пшениці без екзогенного трансгенного селективного маркера (наприклад, PAT) можуть бути відновлені шляхом скринінгу T_1 рослин, що мають походження від цих подій, при використанні ПЛР аналізів, специфічних або для PAT, або для модифікованих генів AHAS.

Усі патенти, патентні заявки та публікації, які згадуються у даній заявці, є введеними як посилання у своїй цілісності.

Незважаючи на те, що опис був забезпечений більш докладно як ілюстрація та приклад для цілей ясності розуміння, кваліфікованому спеціалісту у даній галузі техніки буде зрозумілим, що можуть бути здійснені різноманітні зміни та модифікації без відходу від духу або обсягу даної заявки. У відповідності із цим приведені вище опис та приклади не повинні розглядатися як такі, що є обмежувальними.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Dow AgroSciences LLC
Sangamo BioSciences, Inc.

<120> СПОСІБ ТА КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ІНТЕГРАЦІЇ ЕКЗОГЕННОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ У ГЕНОМ РОСЛИН

<130> 72287-US-NP

<160> 314

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1
<211> 2259
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Гомологічна послідовність гена AHAS

<220>
<221> misc_feature
<222> (2207)..(2207)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (2210)..(2210)

<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 1
tcgcccaaac cctcgccgcc gccatggccg cagccacctc ccccgccgtc gcattctcgg 60

gcgccaccgc cgccgccatg cccaaacccg cccgccatcc tctcccgcgc caccagcccg 120

tctcgcgccg cgcgctcccc gcccgcgtcg tcaggtgttg cgccgcgtcc cccgccgcca 180

cctccgccgc gcctcccgca accgcgctcc ggccatgggg cccgtccgag ccccgcaagg 240

gcgccgacat cctcgtcgag gcgctcgagc gctgcggcat cgtcgacgtc ttcgcctacc 300

ccggcggcgc ctccatggag atccaccagg cgctgacgcg ctcgcccgtc atcaccaacc 360

acctcttccg ccacgagcag ggggaggcgt tcgcggcgtc cggctacgcc cgcgcgtccg 420

gccgcgtcgg cgtctgcgtc gccacctccg gcccgggggc caccaacctc gtctccgcgc 480

tcgccgacgc cctcctcgac tccatcccca tggtcgccat cacgggccag gtcccccgcc 540

gcatgatcgg cacggacgcg ttccaggaga cgcccatagt ggaggtcacg cgctccatca 600

ccaagcacaa ctacctggtc cttgacgtgg aggatatccc ccgcgtcatc caggaagcct 660

tcttccttgc atcctctggc cgcccggggc cggtgctagt tgatatcccc aaggacatcc 720

agcagcagat ggctgtgccc gtctgggaca ctccaatgag tttgccaggg tacatcgccc 780

gcctgcccaa gccaccatct actgaatcgc ttgagcaggt cctgcgtctg gttggcgagt 840

cacggcgccc aattctgtat gttggtggtg gctgcgctgc gtctggcgag gagttgcgcc 900

gctttgttga gcttactggg attccagtta caactactct gatgggcctt ggcaacttcc 960

ccagcgacga cccactgtct ctgcgcatgc ttgggatgca tggcactgtg tatgcaaatt 1020

atgcagtaga taaggctgac ctgttgctcg catttggtgt gcggtttgat gatcgtgtga 1080

ctgggaaaat cgaggctttt gcaagcaggt ccaagattga gcacattgac attgacccag 1140

ctgagattgg cagaacaagc agccacatgt ctccatttgt gcagatgtta agcttgcttt 1200

acaggggttg aatgatctat taaatgggag caaagcacaa cagggtctgg attttggtcc 1260

atggcacaag gagttggatc agcagaagag ggagtttcct ctaggattca agacttttgg 1320

cgaggccatc ccgccgcaat atgctatcca ggtactggat gagctgacaa aaggggaggc 1380

gatcattgcc actggtgttg ggcagcacca gatgtgggcg gctcagtatt acacttacaa 1440

gcggccacgg cagtggctgt cttcgtctgg tttgggggca atgggatttg ggttaccagc 1500

tgcagctggc gctgctgtgg ccaacccagg tgttacagtt gttgacattg atggtgatgg 1560

tagtttcctc atgaacattc aggagttggc gttgatccgc attgagaacc tcccagtgaa 1620

ggtgatgata ttgaacaacc agcatctggg aatggtggtg cagtgggagg ataggtttta 1680

caaggccaat cgggcgcaca cataccttgg caacccagaa aatgagagtg agatatatcc 1740

agattttgtg acgattgcta aaggattcaa cgttccagca gttcgagtga cgaagaagag 1800

cgaagtcact gcagcaatca agaagatgct tgagacccca gggccatact tgttggatat 1860

catagtcccg catcaggagc acgtgctgcc tatgatccca agcggtggtg ctttcaagga 1920

catgatcatg gagggtgatg gcaggacctc gtactgaaat ttcgacctac aagacctaca 1980

agtgtgacat gcgcaatcag catgatgccc gcgtgttgta tcaactacta ggggttcaac 2040

tgtgagccat gcgttttcta gtttgcttgt ttcattcata taagcttgta ttacttagtt 2100

ccgaaccctg tagttttgta gtctatgttc tcttttgtag ggatgtgctg tcataagatg 2160

tcatgcaagt ttcttgtcct acatatcaat aataagtact tccatgnaan aaaaaaaaaa
2220

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa
2259

<210> 2
<211> 2265
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Гомологічна послідовність гена AHAS

<220>
<221> misc_feature
<222> (2213)..(2213)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (2216)..(2216)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 2
tcgcccaaac cctcgccgcc gccatggccg cagccacctc ccccgccgtc gcattctcgg
60

gcgccgccgc cgccgccgcc gccataccca aacccgcccg ccagcctctc ccgcgccacc
120

agcccgcctc gcgccgcgcg ctccccgccc gcatcgtcag gtgctgcgcc gcgtcccccg
180

ccgccacctc cgtcgcgcct cccgccaccg cgctccggcc gtggggcccc tccgagcccc
240

gcaagggcgc cgacatcctc gtcgaggcgc tggagcgctg cggcatcgtc gacgtcttcg
300

cctaccctgg cggcgcgtcc atggagatcc accaggcgct gacgcgctcg ccagtcatca
360

ccaaccacct cttccgccac gagcaggggg aggcgttcgc ggcgtccggg tacgcccgcg
420

cgtccggccg cgtcggcgtc tgcgtcgcca cctccggccc gggggccacc aacctcgtct
480

ccgcgctcgc cgacgctctc ctcgactcca tccccatggt cgccatcacg ggccaggtcc
540

cccgccgcat gatcggcacg gatgcgttcc aggagacgcc catcgtggag gtcacgcgct 600

ccatcaccaa gcacaactac ctggtccttg acgtggagga tatcccccgc gtcatccagg 660

aagccttctt cctcgcatcc tctggccgcc cggggccggt gctggttgat atccccaagg 720

acatccagca gcagatggct gtgcctgtct gggacacgcc gatgagtttg ccagggtaca 780

tcgcccgcct gcccaagcca ccatctactg aatcgcttga gcaggtcctg cgtctggttg 840

gcgagtcacg gcgcccaatt ctgtatgttg gtggtggctg cgctgcatct ggtgaggagt 900

tgcgccgctt tgttgagctc actgggattc cagttacaac tactcttatg ggccttggca 960

acttccccag tgacgaccca ctgtctctgc gcatgctggg gatgcatggc actgtgtatg 1020

caaattatgc agtagataag gctgacctgt tgcttgcatt tggtgtgcgg tttgatgatc 1080

gtgtgaccgg gaaaatcgag gcttttgcaa gcaggtccaa gattgagcac attgacattg 1140

acccagctga gattggcaga acaagcagcc acatgtctcc atttgtgcag atgttaagct 1200

tgctttacag gggttgaatg ctctattaaa tgggagcaaa gcacaacagg gtctggattt 1260

tggtccatgg cacaaggagt tggatcagca gaagagggag tttcctctag gattcaagac 1320

ttttggtgag gccatcccgc cgcaatatgc tatccaggta ctggatgagc tgacaaaagg 1380

ggaggcgatc attgccaccg gtgttgggca gcatcagatg tgggcggctc agtattacac 1440

ttacaagcgg ccacggcagt ggctgtcttc atccggtttg ggtgcaatgg gatttgggtt 1500

gccagctgca gctggcgctg ctgtggccaa cccaggtgtt acagttgttg acattgatgg 1560

ggatggtagt ttcctcatga acattcagga gttggcgttg atccgtattg agaacctccc 1620

agtgaaggtg atgatattga acaaccagca tctgggaatg gtggtgcagt gggaggatag 1680

gttttacaag gccaaccggg cgcacacata ccttggcaac ccagaaaatg agagtgagat 1740

atatccagat tttgtgacga ttgctaaagg attcaacgtt ccggcagttc gtgtgacgaa 1800

gaagagcgaa gtcactgcag caatcaagaa gatgcttgag accccagggc catacttgtt 1860

ggatatcatt gtcccgcatc aggagcacgt gctgcctatg atcccaagcg gtggtgcttt 1920

taaggacatg atcatggagg gtgatggcag gacctcgtac tgaaatttcg acctacaaga 1980

cctacaagtg tgacatgcgc aatcagcatg atacctgcgt gttgtatcaa ctactggggg 2040

ttcaactgtg aaccatgcgt tttctagttt gcttgtttca ttcatataag cttgtgttac 2100

ttagttccga accgtgtagt tttgtagtct ctgttctctt ttgtagggat gtgctgtcat 2160

aagatatcat gcaagtttct tgtcctacat atcaataata agcacttcca tgnaanaaaa 2220

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 2265

<210> 3
<211> 2259
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Гомологічна послідовність гена AHAS

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (66)..(66)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (80)..(80)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (98)..(98)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (121)..(121)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (147)..(147)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (158)..(158)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (2207)..(2207)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (2210)..(2210)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 3
tcgcccaaac cctcgccgcc gccatggccg cngccacctc ccccgccgtc gcattctcgg 60

gcgccnccgc cgccgccatn cccaaacccg cccgccancc tctcccgcgc caccagcccg 120

nctcgcgccg cgcgctcccc gcccgcntcg tcaggtgntg cgccgcgtcc cccgccgcca 180

cctccgccgc gccccccgcc accgcgctcc ggccctgggg cccgtccgag ccccgcaagg 240

gcgccgacat cctcgtcgag gcgctcgagc gctgcggcat cgtcgacgta ttcgcctacc 300

ccggcggcgc gtccatggag atccaccagg cgctgacgcg ctcgcccgtc atcaccaacc 360

acctcttccg ccacgagcag ggggaggcgt tcgcggcgtc cggctacgcc cgcgcgtccg 420

gccgcgtcgg cgtctgcgtc gccacctccg gcccgggggc caccaacctc gtctccgcgc 480

tcgctgacgc cctcctcgac tccatcccca tggtcgccat cacgggccag gtcccccgcc
540

gcatgatcgg cacggacgcg ttccaggaga cgcccatagt ggaggtcacg cgctccatca
600

ccaagcacaa ctacctggtc cttgacgtgg aggatatccc ccgcgtcatc caggaagcct
660

tcttcctcgc gtcctctggc cgcccggggc cggtgctggt tgatatcccc aaggatatcc
720

agcagcagat ggccgtgcct atctgggaca cgccgatgag tttgccaggg tacatcgccc
780

gcctgcccaa gccaccatct actgaatcgc ttgagcaggt cctgcgtctg gttggcgagt
840

cacggcgccc aattctgtat gttggtggtg gctgcgctgc atccggcgag gagttgcgcc
900

gctttgttga gctcactggg attccggtta caactactct gatgggcctt ggcaacttcc
960

ccagcgacga cccactgtct ctgcgcatgc ttgggatgca tggcactgtg tatgcaaatt
1020

atgcagtcga taaggctgac ctgttgcttg catttggtgt gcggtttgat gatcgcgtga
1080

ctgggaaaat cgaggccttt gcaagcaggt ccaagattga gcacattgac attgacccag
1140

ctgagattgg cagaacaagc agccacatgt ctccatttgt gcagatgtta agcttgcttt
1200

acaggggttg aatgctctat taaatgggag caaagcacaa cagggtctgg attttggtcc
1260

atggcacaag gagttggatc agcagaagag ggagtttcct ctaggattca agacttttgg
1320

cgaggccatc ccgccgcaat atgctatcca ggtactggat gagctgacaa aaggggaggc
1380

gatcattgct actggtgttg ggcagcacca gatgtgggcg gctcagtatt acacttacaa
1440

gcggccacgg cagtggctgt cttcgtctgg tttgggggca atgggatttg ggttaccagc
1500

tgcagctggc gctgctgtgg ccaacccagg tgttacagtt gttgacattg atggagatgg
1560

tagtttcctc atgaacattc aggagttggc attgatccgt attgagaacc tccctgtgaa
1620

ggtgatgata ttgaacaacc agcatctggg aatggtggtg caatgggagg ataggtttta 1680

caaggccaat cgggcgcaca cataccttgg caacccagaa aatgagagtg agatatatcc 1740

agattttgtg acgattgcta aaggattcaa cgttccggca gttcgtgtga cgaagaagag 1800

cgaagtcact gcagcaatca agaagatgct tgagacccca gggccatact tgttggatat 1860

catcgtcccg catcaggagc acgtgctgcc tatgatccca agcggtggtg ctttcaagga 1920

catgatcatg gagggtgatg gcaggacctc gtactgaaat ttcgacctac aagacctaca 1980

agtgtgacat gcgcaatcag catggtgccc gcgtgttgta tcaactacta ggggttcaac 2040

tgtgaaccat gcgttttcta gtttgcttgt ttcattcata taagcttgtg ttacttagtt 2100

ccgaaccctg tagctttgta gtctatgctc tcttttgtag ggatgtgctg tcataagata 2160

tcatgcaagt ttcttgtcct acatatcaat aataagtact tccatgnaan aaaaaaaaaa 2220

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 2259

<210> 4
<211> 4357
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Гомологічна послідовність гена AHAS з субгеному A

<400> 4
cgttgtgcct tggcagtctc aggttgagcc ctcaccattg aagtagcatg ggtcattgga 60

ttgacccgat ttgacggcgg atctattgga tcttcccttt gtgtcgtttt atactggtat 120

agatgtttaa cacatatttg gaaaatatat tcaaaacatg tttctataaa aaagtttaaa 180

ctatacatgt ataatggaag tcatttataa gaaatgtttt acatgtataa aagatgtaca 240

tcatatgtgc aaaagtagac atgtgttaga aaaaataaac aaacaaatac ataaaaagaa 300

aatcaaagaa aaaacaaccc aaaaaaccaa agaaaataaa gaagaagaag aaaaagagaa 360

aaaacattga aaatcaaaga agaaaaaaac ataaagaaaa gaaaaccgaa aaatactggc 420

aaaaacacac aaaaaatgaa aagaaaaaat aaagaaaacc ggactttacc aatcgaacgg 480

agcgatcgga cacgaatgag cgaaggcatg catcgagcaa caccgctaat tgaccggccc 540

gtagtcgttc gcccgtagac cattcataag aatcggtatc ggagagacat aggggttctt 600

tggtttctaa ccatatcttg tcacacttta ccatacatca ccttagtcaa atctgatcaa 660

attaggtgag tatttggttc tagccacatc taaggcaaga tttgtttttc tgagcagtga 720

accccatatg tcatagacag aaaaattgtg aaaagattcc tttagacggt caaagcgtgg 780

ttaacaattt aatcaactca agtaagataa atgcgataaa tgtgacaaaa ataatgtgtt 840

atagaagtat gacaaaaata atcacaatcc aaacagtctg atagcttggc gagtgcaaaa 900

tagatacgaa atctctggtg atatcacacg ggtccaaaat aattgcttgt ttgagcatca 960

gcctttctgc acaaaaaaag ctagcccaaa caaacgagtg gcgtcccatc tgaaccacac 1020

gctcacccgc cgcgtgacag cgccaaagac aaaaccatca cccctcccca attccaaccc 1080

tctctccgcc tcacagaaat ctctcccctc gcccaaaccc tcgccgccgc catggccgcc 1140

gccacctccc ccgccgtcgc attctccggc gccgccgccg ccgccgccgc catgcccaag 1200

cccgcccgcc agcctctccc gcgccaccag cccgcctcgc gccgcgcgct ccccgcccgc 1260

gtcgtcaggt gctgcgccgc gccccccgct gctgccacct ccgccgcgcc ccccgccacc 1320

gcgctccggc cctggggccc gtccgagccc cgcaagggcg ccgacatcct cgtcgaggcg 1380

ctcgagcgct gcggcatcgt cgacgtattc gcctaccccg gcggcgcgtc catggagatc 1440

caccaggcgc tgacgcgctc gcccgtcatc accaaccacc tcttccgcca cgagcagggg 1500

gaggcgttcg cggcgtccgg ctacgcccgc gcgtccggcc gcgtcggcgt ctgcgtcgcc 1560

acctccggcc cgggggccac caacctcgtc tccgcgctcg ctgacgccct cctcgactcc 1620

atccccatgg tcgccatcac gggccaggtc ccccgccgca tgatcggcac ggacgcgttc 1680

caggagacgc ccatagtgga ggtcacgcgc tccatcacca agcacaacta cctggtcctt 1740

gacgtggagg atatcccccg cgtcatccag gaagccttct tcctcgcgtc ctctggccgc 1800

ccggggccgg tgctggttga tatccccaag gatatccagc agcagatggc cgtgcctatc 1860

tgggacacgc cgatgagttt gccagggtac atcgtcccgc ctgcccaagc caccatctac 1920

tgaatcgctt gagcaggtcc tgcgtctggt tggygagtca cggcgcccaa ttctgtatgt 1980

tggtggtggc tgcgctgcat ccggcgagga gttgcgccgc tttgttgagc tcactgggat 2040

tccggttaca actactctga tgggccttgg caacttcccc agcgacgacc cactgtctct 2100

gcgcatgctt gggatgcatg gcactgtgta tgcaaattat gcagtcgata aggctgacct 2160

gttgcttgca tttggtgtgc ggtttgatga tcgcgtgact gggaaaatcg aggcctttgc 2220

aagcaggtcc aagattgtgc acattgacat tgacccagct gagattggca agaacaagca 2280

gccacatgtc tccatttgtg cagatgttaa gcttgcttta caggggttga atgctctatt 2340

aaatgggagc aaagcacaac agggtctgga ttttggtcca tggcacaagg agttggatca 2400

gcagaagagg gagtttcctc taggattcaa gacttttggc gaggccatcc cgccgcaata 2460

tgctatccag gtactggatg agctgacaaa aggggaggcg atcattgcta ctggtgttgg 2520

gcagcaccag atgtgggcgg ctcagtatta cacttacaag cggccacggc agtggctgtc 2580

ttcgtctggt ttgggggcaa tgggatttgg gttaccagct gcagctggcg ctgctgtggc 2640

caacccaggt gttacagttg ttgacattga tggagatggt agtttcctca tgaacattca 2700

ggagttggca ttgatccgta ttgagaacct ccctgtgaag gtgatgatat tgaacaacca 2760

gcatctggga atggtggtgc aatgggagga taggttttac aaggccaatc gggcgcacac 2820

ataccttggc aacccagaaa atgagagtga gatatatcca gattttgtga cgattgctaa 2880

aggattcaac gttccggcag ttcgtgtgac gaagaagagc gaagtcactg cagcaatcaa 2940

gaagatgctt gagaccccag ggccatactt gttggatatc atcgtcccgc atcaggagca 3000

cgtgctgcct atgatcccaa gcggtggtgc tttcaaggac atgatcatgg agggtgatgg 3060

caggacctcg tactgaaatt tcgacctaca agacctacaa gtgtgacatg cgcaatcagc 3120

atggtgcccg cgtgttgtat caactactag gggttcaact gtgaaccatg cgttttctag 3180

tttgcttgtt tcattcatat aagcttgtgt tacttagttc cgaaccctgt agctttgtag 3240

tctatgctct cttttgtagg gatgtgctgt cataagatat catgcaagtt tcttgtccta 3300

catatcaata ataagtactt ccatggaata attctcagtt ctgttttgaa ttttgcatct 3360

tctcacaaac agtgtgctgg ttcctttctg ttactttaca tgtctgccgt gtccggttat 3420

gacataatga ccgatggagg gtggtcagca ggttttagac ggggagttga aacttttttt 3480

tgggggggaag aaatctgaat acagttggga ggaaagataa aagcatatac cttgattaat 3540

ttattgagcc caatatccag cctaatttat caagcaatag gcagtgtagg gtgttggcat 3600

tcttctcttc cttgagatct ggtgtcggga ccccgattct aagtcacacc gatctagcat
3660

gtaacacctc atatcacttt gcggcctcac gcacggtatc ctcacgggtg tcgccttacc
3720

atggcccggg accgtttgcg ccttttggct cacgtatatg atggtgtcgc tagyatccat
3780

atgacagaga acccgggccg acatrgctag tcgtgaaccc aaagcggcac agacctatgg
3840

agacaggcat acatgaatca catcgagcat gtcggtcaac agcgtatgaa tccgggctgt
3900

agcactgggc taacaggact ccggggaacc cgggctgtag caggctaggc aggactccgg
3960

aagtcaccgc gtgacatttc cccgaaggga cagacatagg aacgaagtgg aacacatgcc
4020

ggccagtcaa gtgttctgag cagtagtgct gggctagcag gactccggtg aaccgggctg
4080

tagcggacta ctatggctcg aggtagcact agactacatt tccccataag agaggctkcc
4140

aaggataagc aactagattg tcggrtcycr srywttgtct ccgtgtgttg ttattgttgt
4200

catgcaagta tgtgttgtac aacatggcat cacaacataa cgcaaactca tatagatata
4260

ggctcagaga gccacatagc attaatacga acagggtcac atgacccatc attcagagca
4320

tacagcatga agcatcatgt ctgagtacag acactac
4357

<210> 5
<211> 7585
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Гомологічна послідовність гена AHAS з субгеному B

<400> 5
ctgaaaattc aatatggccc tcgggcacca atgctcttgc ttccaatttt cataattccc
60

atttgtaaaa aacacaccac aaaaatcaca ctgtagtaat ctacatgttt gttgagccta
120

taaatcttca taaaataatt gagattaatg cggtttgtgc aaaaatatgg ggttggtcat 180

gtttctacat atttctattt gcatttcgtt aactggtgct tgttattttt gtacataatg 240

catatctcat tgttattatt tttaaccttt tgagatggta acgaagatcc aaacatgcat 300

agatgattct ccggatgatt ttttgtagcc tgcactagga actcccaaga gccagaaggt 360

tgggtttgta caagataaca tttgtttgaa cacactcata acctgcatgt gacatacatg 420

acgtaactta tagtgatgat tcgacaaatg tctctttgtc caattttgtt atatatcccg 480

tggcaacgca cgggcattcg actagtatat gtaaagatat caatgtgacg agtccccatg 540

gtcgttgcgc ttgtccacta ccggctcgct agaggcgact ctcacctaga agtcgctacg 600

agcaatacat agtcgttctg ggcgcagcta tgttctgcct tttgcgacgc tcaggcacgg 660

cttgcctaca gcctgagggt cgggctagga accactaatt gtgtcatgct gatgtcacaa 720

tgacatcatg catattttta ttttcgtttt tcgctttctc tttaatttta tttgtatttc 780

aaaatatttt atatattttt tgaatttttt caatgttgta tttgaaaaat gttaaacctg 840

tatagagaaa aatatttttg atatatataa aagtatataa catgaatgaa aaatgtataa 900

atgttaatta tgtgtaccaa aaatgttgat aacaattagc agtctcacat atttcaaaat 960

aaatgtatgt ggaattaaaa aatatgtgta tttaagttta aaaaaaatgt tcatgtaatg 1020

ttcgtaaaat gtttgataca ttcaataaaa attatgtcac atttgaataa ttcttctcaa 1080

gcttaacaaa tgcgctcatt atattatcaa aaattgtctg tacagtgtac acaaatgttt 1140

atgtagttca aaaaaaatgt tttttcagta aaaatatatt tgatcatgta ttttataaaa 1200

aactgtttaa tatatattta gaaaatatat tcaaaacatg tttctgtaaa aagttaaaac 1260

tatacatgta taatgtaagt catttataat aaatgtttta catgtataaa aaatgtacaa 1320

catatgtgca aaagtagaca tgtgttgaaa aaataaacaa ataactaaat aaaaagaaaa 1380

tcaaagaaaa acaccaaaaa ccaaagaaat aaataaaacc aaagtataaa gaagarraaa 1440

ggagaaaaaa cattgaaaat caaagaraaa aacataaaga agaaaaaaac cgaagaaaac 1500

tagcaaaaaa cacacacaca aaaaagaaaa tgaaaagaaa taataaagaa agccggactg 1560

aaccgatcaa acgcagcgat cgaacatgga tgagctaagg catgcatcga acaacacggc 1620

taattggccg gcccgtagtc gttcgcccgt agaccattcc tacgaatcgg taccggagag 1680

acataggggc tgtatggttc ctaaccatac cttgccacac tttgtcacac ctcatcttag 1740

gcaaatttaa tcaagttatg taggtgtttg gttttagcca catctaaggc aagatttatt 1800

ttcctgagca gtgaacccca tatgttatag acataaaaag tgtgggaaga ttccctttag 1860

tcaaactgtg gctaacaatt tattaagaat taacttaagt aagataggtg caacaaatgt 1920

agcaaaaata atgtggtata tatagcaaag atagccacaa ccgcgagtgg aaataccaga 1980

tacgagatct ctggtcatat cacacgagtc caaattaatt gctttgtttg aggttcagcc 2040

ttttgcataa aaaagctagc ccaaacaaac gagtggcgtc ccatctgaac cacacactca 2100

cccgccgcgt gacagcgcca aagacaaaac catcacccct ccccaattcc aaccctctct 2160

ctgcctcaca gaaatctctc cctcgcccaa accctcgccg ccgccatggc cgcagccacc 2220

tcccccgccg tcgcattctc gggcgccgcc gccgccgccg ccgccatacc caaacccgcc 2280

cgccagcctc tcccgcgcca ccagcccgcc tcgcgccgcg cgctccccgc ccgcatcgtc 2340

aggtgctgcg ccgcgtcccc cgccgccacc tccgtcgcgc ctcccgccac cgcgctccgg 2400

ccgtggggcc cctccgagcc ccgcaagggc gccgacatcc tcgtcgaggc gctggagcgc 2460

tgcggcatcg tcgacgtctt cgcctaccct ggcggcgcgt ccatggagat ccaccaggcg 2520

ctgacgcgct cgccagtcat caccaaccac ctcttccgcc acgagcaggg ggaggcgttc 2580

gcggcgtccg ggtacgcccg cgcgtccggc cgcgtcggcg tctgcgtcgc cacctccggc 2640

ccgggggcca ccaacctcgt ctccgcgctc gccgacgctc tcctcgactc catccccatg 2700

gtcgccatca cgggccaggt cccccgccgc atgatcggca cggatgcgtt ccaggagacg 2760

cccatcgtgg aggtcacgcg ctccatcacc aagcacaact acctggtcct tgacgtggag 2820

gatatccccc gcgtcatcca ggaagccttc ttcctcgcat cctctggccg cccggggccg 2880

gtgctggttg atatccccaa ggacatccag cagcagatgg ctgtgcctgt ctgggacacg 2940

ccgatgagtt tgccagggta catcgcccgc ctgcccaagc caccatctac tgaatcgctt 3000

gagcaggtcc tgcgtctggt tggcgagtca cggcgcccaa ttctgtatgt tggtggtggc 3060

tgcgctgcat ctggtgagga gttgcgccgc tttgttgagc tcactgggat tccagttaca 3120

actactctta tgggccttgg caacttcccc agtgacgacc cactgtctct gcgcatgctg 3180

gggatgcatg gcactgtgta tgcaaattat gcagtagata aggctgacct gttgcttgca 3240

tttggtgtgc ggtttgatga tcgtgtgacc gggaaaatcg aggcttttgc aagcaggtcc 3300

aagattgtgc acattgacat tgacccagct gagattggca agaacaagca gccacatgtc 3360

tccatttgtg cagatgttaa gcttgcttta caggggttga atgctctatt aaatgggagc 3420

aaagcacaac agggtctgga ttttggtcca tggcacaagg agttggatca gcagaagagg 3480

gagtttcctc taggattcaa gacttttggt gaggccatcc cgccgcaata tgctatccag 3540

gtactggatg agctgacaaa aggggaggcg atcattgcca ccggtgttgg gcagcatcag 3600

atgtgggcgg ctcagtatta cacttacaag cggccacggc agtggctgtc ttcatccggt 3660

ttgggtgcaa tgggatttgg gttgccagct gcagctggcg ctgctgtggc caacccaggt 3720

gttacagttg ttgacattga tggggatggt agtttcctca tgaacattca ggagttggcg 3780

ttgatccgta ttgagaacct cccagtgaag gtgatgatat tgaacaacca gcatctggga 3840

atggtggtgc agtgggagga taggttttac aaggccaacc gggcgcacac ataccttggc 3900

aacccagaaa atgagagtga gatatatcca gattttgtga cgattgctaa aggattcaac 3960

gttccggcag ttcgtgtgac gaagaagagc gaagtcactg cagcaatcaa gaagatgctt 4020

gagaccccag ggccatactt gttggatatc attgtcccgc atcaggagca cgtgctgcct 4080

atgatcccaa gcggtggtgc ttttaaggac atgatcatgg agggtgatgg caggacctcg 4140

tactgaaatt tcgacctaca agacctacaa gtgtgacatg cgcaatcagc atgatacctg 4200

cgtgttgtat caactactgg gggttcaact gtgaaccatg cgttttctag tttgcttgtt 4260

tcattcatat aagcttgtgt tacttagttc cgaaccgtgt agttttgtag tctctgttct 4320

cttttgtagg gatgtgctgt cataagatat catgcaagtt tcttgtccta catatcaata 4380

ataagcactt ccatggaata attctcagtt ctgttttgaa tttcacatct tctcacgaac 4440

agtgtgctgg ttccttttctg ttactttaca tgcctgccgt gtcaggttat gacataacga 4500

ccgatggagg attggagggt ggtcggctgg ttttagacgg ggaattgaaa catttttctg 4560

gaagaaatct gaatacagtt gggaggggaa atggaagcat atatttatcg agcccgctat 4620

ccaggctaat ttatcaagca ctagacagtg tagggtgttg gcattcttct cttccttgat 4680

atccggcttg agaggagaga ttgaggcttc ggctgtgttg gttgctgatt tctacagcat 4740

tttgagagag agagagagat gttgcaactg tgttttgtct tggttgcttg tacagagaaa 4800

gagatgacat ttagagatat gcagatcgtt taccagttgt gctgcgttta ttcgtactga 4860

ttgttgttat tgttgctatc atgtgcaaat tgttgtgatg gaaaatcaac aaaattttga 4920

tattttgcaa agcgagttgg attgaatgat ttgagaaatg gtgacttgtt gagtggcctt 4980

gagaattggt gtttcatagg tgtgcagttg gtaatgaaag gcggcggctt gaaatttccg 5040

aaaggcaggc aatgatactt tctgaaagtg atgtttttc ttccaggttt ccggtggaac 5100

aagtctacgt tgagccaatg tttgtcagct tattctgctc tttagtttca gttgttttgt 5160

tcacagattg ctgggcagag ccccatgatc ggctgagcct ccaggagatc cttgattgct 5220

cgactgcgga tacgttgaat cctttaaaat actataagct ccctagtttt agttttagag 5280

aactgagaat caattgaggg caacattagt cgattttggc ttccgatttt gactgggtcg 5340

cctccctggg tcctctacag ttttgtgggc cctatatgta agtgccccag tgttgtgggc 5400

tttctggtct tttctgatga aagcggcgtg gtggctgggg gctttagaat atttcattga 5460

ttaactaaaa caaatcagat ccctttttcc tgcttcatgt gtgtttgacc aatcttttt 5520

taaaaatttc tttgatttta tatttgatgg agtaaatctg gctgtgtcaa cggtagtcca 5580

ttcgaaacct ggaaatcgaa atcattgtac tgcaggtctg ttgcctgtta gtttgttctt 5640

atataagatc tttgacagtt tatgaatttg tctttggaat ttgtataaag tttcacagat 5700

agacaggccc tgttgttaaa tacgttcgtg caattaagtg taaacatatc tgccagtgat 5760

ttttctcggc tcgcattagt acgcataaat ttttagcact tctctgaatt ttctcatatg 5820

cagaccacct atgaaaaaaa cgacatgcaa gtaaataaaa cgatttcagg ttcatttagt 5880

agcaaaccgt ttttatgtcc tttaaaaatc aattagcaga gccactccat tcaccggtca 5940

gcagaaaaga agcatgtgtg tgtttttggg ctatcataga gctaaataaa tttgattccc 6000

atctgtaatg ttcatcgttg tttacatcag tgttggctgt cgtgtggtcg tggagactag 6060

cctgttcaga caatatgttt gacaagagtg ttgttttgtg agatgcggat gcggtgcttg 6120

catctgtact tgtttttgtg aataccagtt agatgatcag tttttgtgca cttcttgcca 6180

tgaatggctg ttaaattgtc acttttttagg aacttgttgc cgtaatatca attaaataat 6240

caatttttgt gcatggtata tcaattagat ggtcattttt ttctagtaga gatgtctata 6300

catgccaatg caatgttcag agttgttcaa ggtctcgacg gcgcggcaaa gcgcgtccta 6360

tgcttctagt ttaagatgac aaccaaacac gacccaagtg tatgctatgc tcatccggtt 6420

ggtccttgtt gatgttcaat gggcgtgtct ccatgggcat cgacggcgac aatgttatct 6480

tcttcaactg tctgctatat gctcattggc atttttgaaa ctttgcaagc aaggtcgata 6540

acttggtctg gggatgttga cgcccctatg tatctagatt agggtgatgc tcccgccagt 6600

atttttgga cgattatcaa catttgcggc tggtatacta ttgtggctaa tcaacaaggt 6660

ttttttgtgt gtggctaatc aacaaggttt ggcgctcgat gtttttttaa tgtatttcga 6720

tgactcaatt tctacgtctg aacatttcat tgagccaaga ggcagaacaa caggtcacat 6780

gtaaccgcca gtgaaaaagg ttcaaagaag aaaaagatac gaacgacagc gagtttgtat 6840

kkcagttttc gaactaagag taacacggag trcagtagta cgatccttgt gtmyttctgt 6900

atttggwtak ttttttttccg gagttgagta ttwgwaactt tcttgtgctt tttttaacat 6960

tagtacagat gcaagtgctc atacatacgc gctttttgat ttgtaacaat attatgaaag 7020

acgtagtaat tatgtttgca gatcaataaa gctagccatc gtgtggtgtt cccaagaaaa 7080

agatattcac tatagattca ctacatcttc taaaaaaact acactgtaga ttcactacag 7140

accaacagaa tattcatggt cacgtggata aaaacttact ttttgaaagt ctcaagcatt 7200

tggtttgatt ttaagaaaaa ataactgact ctatttttgt gtactccttg caacgaacct 7260

ggataaagat ggagccagtc cgttcctggt tactaggagt atccatttcc tgaagaccat 7320

ggagcaacca cggcggatcg ggcgatcggc agcctcccag ccggcgacca tggcggatgc 7380

cacgagcgca ggagcgacgc ctctcctccc tggcctcctc gacgacatcg taatctgtga 7440

gatccttgtc cgcctcgccc cccaaagcca tcctccgctg ccgcgccgtc acgccgtgcc 7500

tggcgccgca ccacctccac ccgcgacttc ctcctcgccc accacgcccg ccagcccgcc 7560

ctcctcatca cctccggcca cagtt
7585

<210> 6
<211> 6195
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Гомологічна послідовність гена AHAS з субгеному D

<400> 6
aaatttttat aatattgttt ttccaaattt tatgtttaaa ctcatttttg ttcaatttttt 60

tgtgaatata ttttaatcca ttgatagatt ttgaaaatat aataattttt ccaaaacatt 120

ctataatttc ataaaccttt ttaacatttc aagaataaga ttaggaaatt ttgattctta 180

aaatatattt ttaatcttgc aactacattt ttatatacaa ttacatgagc caatttattt 240

tggtagaaat caactgaaaa aacaaaagaa aaaattggaa tagcgggagt tctctgcgcg 300

aacttggggg gggggggcga caaccctcta tcaatgagct agggattcct attacatctc 360

gcctacaagc cgcactagtt ttttycccat ttgttttata tcggtttttt actacttttg 420

caccggtttt cttctggtat tatttcattt ttcttctata ctttctgttg ttttcttcgt 480

ttccccctcc tgtttttttg tcttttttcta cagtttcctt gtttctttct ttggttttca 540

ccgatttact ttgtttttca cgtttttaaa ttttaatttt aatcttcaga tacataatta 600

acattcatta aattatatac ttttatgtca agtttttttca tacacattgt gcattttata 660

catattagga ttcttaaata catgattaat attttattca gacatagagt acttgttttg 720

aacacttttt caaatacatg ttgaaataat ttattttatg atatgaaata tgttttttta 780

ttatgcaaac atttttatac actttatgtt tttttgaaat attacaaaat ttttgcttga 840

aacgtgtgaa catttttttaa aatgtaacat aatttttttga atggtatgaa actttttttga 900

actgcgcgaa cattattttt acattgtata ttattttgat tcattttctg taagttatcg 960

cctgaattgc ttgaaaaacg tgatttttttt taaatgccac atatattgtt tttgaatggt 1020

tcatgcattt tctgaaagtt gatcgaacat gtttttatat tgcatttttta aaatgtaata 1080

accacttttg aaaattaact aatgtatttt cataatatat gtatttaata ttattaaaaa 1140

taaaaaaaag gtaaaagaaa aaacagatca acgcgatgag accccatggt tgttgcgctt 1200

gtccactacc ggctcactga agacgtctct cacagtagga gtcgctacga agaatacata 1260

gtcgcgctgg gcgcggttat gttccgcctg ttgcgacgcc caagcatggc ttgcctacag 1320

ctagagggtc gggctaggaa ccactaattg tgtcatgctg atgtcacaat gacatcatac 1380

atgcttttat tttaattttt cgctttctct ttaaattttt ttgtatttca aaatattctg 1440

ttttttaag aatgctagta ttgtatttga aaaatgttaa acctgtatag aaaaatatat 1500

aacatgaatg aaaaatgtat agatgttaat catgtgtaca aaaaatgatt gtgacaatta 1560

agaatgtcac atatttcaaa ataaatgtat gtggaatttt gaaaaaatgt gtatataatt 1620

ttttaatggt catgtaattt taaaaaaatg tgtgatacat tcaacaaaaa atatttcaca 1680

tttgaataat tcttcttgag cttaagaaat gtgttcatta tgttatcaat ttttttgtac 1740

agtgtacaaa aatgtttaca tagttcaaaa aaatgttttt cagtaaaatt acatttcatt 1800

gtgtatttaa tattttaaca cacatttgga aaatatattt gaaacatgtt tttgtaaaaa 1860

aaaatttaaa actatgcttg tactccctcc gtccgaaaaa ggtttacatg tataaaagtt 1920

ttttcggagg gagggattat aatgttagtc atttataaga aatgttttac atgtatgaaa 1980

atgtatagca tatgtgtaaa agtagacatg tgttgaaaaa aaaaagtaaa acaacccaaa 2040

aaaccaatga aaataaaata aaaccaaagt accaagaaga agaaaaggag aataaaccat 2100

tgaaaaacaa agaaaataaa aaacataaag aagaaagaaa cccaaagaaa actggcaaaa 2160

attagacaca gaaaagaaaa acgaaaaaat atataataaa raaaaccgga ctgaaccgat 2220

cggacacgga tgagcgaagg catgcatcga gcaacacagc taattggccg gcccatagtc 2280

gttcgcccgc agaccattca tacgaatcgg taccggagag acataggggc tatttggttt 2340

gtagccacat tttgtcatac tttgtgacac cgcatcttat gcaagtttga ccaaattagg 2400

tggatgttta gttctaacca catgtaaggg aagatttttt tttatgagca ttgaacccgt 2460

agacacaaaa agtgtaggaa gattacttta aacaagctaa agtgtggcta acaatttaag 2520

catctcaggt aagataagtg cgacaaatat ggcaaaaata atgtggtata tatgacaaag 2580

atagtcacaa tccaaacagc ccatagcctg gcgagtgcaa atagatacga gatctctggt 2640

gatatcacaa ccgtccaaat taattgcttg tttcagcatc agccttttg cataaagaag 2700

ctagcccaat ctgaaccaca cactcacccg ccgcgtgaca gcgccaaaga caaaaacatc 2760

acccctcccc aattccaacc ctctctctgc ctcacagaaa tctcccccct cgcccaaacc 2820

ctcgccgccg ccatggccgc cgccacctcc cccgccgtcg cattctcggg cgccaccgcc 2880

gccgccatgc ccaaacccgc ccgccatcct ctcccgcgcc accagcccgt ctcgcgccgc 2940

gcgctccccg cccgcgtcgt caggtgttgc gccgcgtccc ccgccgccac ctccgccgcg 3000

cctcccgcaa ccgcgctccg gccctggggc ccgtccgagc cccgcaaggg cgccgacatc 3060

ctcgtcgagg cgctcgagcg ctgcggcatc gtcgacgtct tcgcctaccc cggcggcgcc 3120

tccatggaga tccaccaggc gctgacgcgc tcgcccgtca tcaccaacca cctcttccgc 3180

cacgagcagg gggaggcgtt cgcggcgtcc ggctacgccc gcgcgtccgg ccgcgtcggc 3240

gtctgcgtcg ccacctccgg cccgggggcc accaacctcg tctccgcgct cgccgacgcc 3300

ctcctcgact ccatccccat ggtcgccatc acgggccagg tcccccgccg catgatcggc 3360

acggacgcgt tccaggagac gcccatagtg gaggtcacgc gctccatcac caagcacaac 3420

tacctggtcc ttgacgtgga ggatatcccc cgcgtcatcc aggaagcctt cttccttgca 3480

tcctctggcc gcccggggcc ggtgctagtt gatatcccca aggacatcca gcagcagatg 3540

gctgtgcccg tctgggacac tccaatgagt ttgccagggt acatcgcccg cctgcccaag 3600

ccaccatcta ctgaatcgct tgagcaggtc ctgcgtctgg ttggcgagtc acggcgccca 3660

attctgtatg ttggtggtgg ctgcgctgcg tctggcgagg agttgcgccg ctttgttgag 3720

cttactggga ttccagttac aactactctg atgggccttg gcaacttccc cagcgacgac 3780

ccactgtctc tgcgcatgct tgggatgcat ggcactgtgt atgcaaatta tgcagtagat 3840

aaggctgacc tgttgctcgc atttggtgtg cggtttgatg atcgtgtgac tgggaaaatc 3900

gaggcttttg caagcaggtc caagattgtg cacattgaca ttgacccagc tgagattggc 3960

aagaacaagc agccacatgt ctccatttgt gcagatgtta agcttgcttt acaggggttg 4020

aatgatctat taaatgggag caaagcacaa cagggtctgg attttggtcc atggcacaag 4080

gagttggatc agcagaagag ggagtttcct ctaggattca agacttttgg cgaggccatc 4140

ccgccgcaat atgctatcca ggtactggat gagctgacaa aaggggaggc gatcattgcc 4200

actggtgttg ggcagcacca gatgtgggcg gctcagtatt acacttacaa gcggccacgg 4260

cagtggctgt cttcgtctgg tttgggggca atgggatttg ggttaccagc tgcagctggc 4320

gctgctgtgg ccaacccagg tgttacagtt gttgacattg atggtgatgg tagtttcctc 4380

atgaacattc aggagttggc gttgatccgc attgagaacc tcccagtgaa ggtgatgata 4440

ttgaacaacc agcatctggg aatggtggtg cagtgggagg ataggtttta caaggccaat 4500

cgggcgcaca cataccttgg caacccagaa aatgagagtg agatatatcc agattttgtg 4560

acgattgcta aaggattcaa cgttccagca gttcgagtga cgaagaagag cgaagtcact 4620

gcagcaatca agaagatgct tgagacccca gggccatact tgttggatat catagtcccg 4680

catcaggagc acgtgctgcc tatgatccca agcggtggtg ctttcaagga catgatcatg 4740

gagggtgatg gcaggacctc gtactgaaat ttcgacctac aagacctaca agtgtgacat 4800

gcgcaatcag catgatgccc gcgtgttgta tcaactacta ggggttcaac tgtgagccat 4860

gcgttttcta gtttgcttgt ttcattcata taagcttgta ttacttagtt ccgaaccctg 4920

tagttttgta gtctatgttc tcttttgtag ggatgtgctg tcataagatg tcatgcaagt 4980

ttcttgtcct acatatcaat aataagtact tccatggaat aattctcagt tctgttttga 5040

attttgcatc ttctcacaaa cagtgtgctg gttccttttct gttactttac atgtctgctg 5100

tgtcaggttc tgacataacg accgatggag ggtggtcggc aggttttaga aggggaattg 5160

aaacttttttt ttgggaagaa gtctgaatac agttgggagg aaaaatagaa gtatatactt 5220

cgattaattt atcaagcccg ctatccagtc taatttatca agcactagac agtgtagggt 5280

gttggcattc ttctcttcct tgagatccgg cttgagagga gagaccgagg cttcggctgt 5340

gttggttgct gatttctaca gctttttgag atagagagag agatcctgca actgtggttt 5400

gtcttgctgc ttgtacagcg agagagacat tgagagatat gtagatcgtt taccagttgt 5460

gctgctgtta ttcgtactgg tactgattgt tgttactgtt gctatcatgt gcaaattgtt 5520

gtgatggaaa atcaacaaaa ttttgatatt ttgcaaagcg agttggattg aatgatttga 5580

gaaatggtga ctgctttccc tcagacttgt tgagtggcct tgagaattgg tgtttcatag 5640

gtggtgtatg cagttgctaa tgaaaggcga cggcttgaaa tttccgaaag gcagccaatg
5700

atactttctg aaagtgatgt ttttttcgtc caggtttccg gtggagcaag tctagacaca
5760

cgttgagcca atgtttgtca gcttattctg ctctttagtt tcagtttagg tgcagttgtt
5820

ttgtttacag attgctgggc agagccccgt gatcggctga gcctccaaga gatccttgct
5880

tgctcgactg cggatacgct gaatccttta aaacgctccc tagttttaag ttttagagaa
5940

ctgagaatca attgggggca acattactgg gtcgcctccc tgggcctcta cagttttgtg
6000

ggccctatat gtaagtgccc cagtgttgtg gggatttgcg gcgtggcggg cggcatttgc
6060

gtcctctctt cggcggcgct gtttcccccc ccttcttgct gcttctggag gaggtggtcg
6120

gcggcgggtg ttgtgggggg tcgcattgga gcggcgcgaa cgccggtcct gctgcatctg
6180

ccgccattgg ttgtt
6195

<210> 7
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 7
tctgtaagtt atcgcctgaa ttgctt
26

<210> 8
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 8
cattgtgaca tcagcatgac acaa
24

<210> 9
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 9
aagcayggct tgcctacagc
20

<210> 10
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 10
aaccaaatrc ccctatgtct ctcc
24

<210> 11
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 11
cgttcgcccg tagaccattc
20

<210> 12
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 12
ggaggggtga tgkttttgtc ttt
23

<210> 13
<211> 17

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 13
tcgcccaaac cctcgcc
17

<210> 14
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 14
gggtcgtcrc tggggaagtt
20

<210> 15
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 15
gccttcttcc tygcrtcctc tgg
23

<210> 16
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 16
gcccgrttgg ccttgtaaaa cct
23

<210> 17
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність праймера

<400> 17
aycagatgtg ggcggctcag tat
23

<210> 18
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 18
gggatatgta ggacaagaaa cttgcatga
29

<210> 19
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 19
agggccatac ttgttggata tcatnc
26

<210> 20
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 20
gccaacaccc tacactgcct ant
23

<210> 21
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 21
tgcgcaatca gcatgatacc nt
22

<210> 22
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 22
acgtatccgc agtcgagcaa nt
22

<210> 23
<211> 25
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 23

gtagggatgt gctgtcataa gatng
25

<210> 24
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 24
ttggaggctc agccgatcan c
21

<210> 25
<211> 3053
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Копія гомологічного гена AHAS з субгеному A

<400> 25
cgttcgcccg tagaccattc ataagaatcg gtatcggaga gacatagggg ttctttggtt
60

tctaaccata tcttgtcaca ctttaccata catcacctta gtcaaatctg atcaaattag
120

gtgagtattt ggttctagcc acatctaagg caagatttgt ttttctgagc agtgaacccc
180

atatgtcata gacagaaaaa ttgtgaaaag attcctttag acggtcaaag cgtggttaac
240

aatttaatca actcaagtaa gataaatgcg ataaatgtga caaaaataat gtgttataga
300

agtatgacaa aaataatcac aatccaaaca gtctgatagc ttggcgagtg caaaatagat
360

acgaaatctc tggtgatatc acacgggtcc aaaataattg cttgtttgag catcagcctt
420

tctgcacaaa aaaagctagc ccaaacaaac gagtggcgtc ccatctgaac cacacgctca
480

cccgccgcgt gacagcgcca aagacaaaac catcacccct ccccaattcc aaccctctct
540

ccgcctcaca gaaatctctc ccctcgccca aaccctcgcc gccgccatgg ccgccgccac
600

ctcccccgcc gtcgcattct ccggcgccgc cgccgccgcc gccgccatgc ccaagcccgc
660

ccgccagcct ctcccgcgcc accagcccgc ctcgcgccgc gcgctccccg cccgcgtcgt
720

caggtgctgc gccgcgcccc ccgctgctgc cacctccgcc gcgccccccg ccaccgcgct
780

ccggccctcg gggcccgtcc gagccccgca agggcgccga catcctcgtc gaggcgctcg
840

agcgctgcgg catcgtcgac gtattcgcct accccggcgg cgcgtccatg gagatccacc
900

aggcgctgac gcgctcgccc gtcatcacca accacctcct tccgccacga gcgaggggga
960

ggcgttcgcg gcgtccggct acgcccgcgc gtccggccgc gtcggcgtct gcgtcgccac
1020

ctccggcccg ggggccacca acctcgtctc cgcgctcgct gacgccctcc tcgactccat
1080

ccccatggtc gccatcacgg gccaggtccc ccgccgcatg atcggcacgg acgcgttcca
1140

ggagacgccc atagtggagg tcacgcgctc catcaccaag cacaactacc tggtccttga
1200

cgtggaggat atcccccgcg tcatccagga agccttcttc ctcgcgtcct ctggccgccc
1260

ggggccggtg ctggttgata tccccaagga tatccagcag cagatggccg tgcctatctg
1320

ggacacgccg atgagtttgc cagggtacat cgtcccgcct gcccaagcca ccatctactg
1380

aatcgcttga gcaggtcctg cgtctggttg gcgagtcacg gcgcccaatt ctgtatgttg
1440

gtggtggctg cgctgcatcc ggcgaggagt tgcgccgctt tgttgagctc actgggattc
1500

cggttacaac tactctgatg ggccttggca acttccccag cgacgaccca ctgtctctgc
1560

gcatgcttgg gatgcatggc actgtgtatg caaattatgc agtcgataag gctgacctgt
1620

tgcttgcatt tggtgtgcgg tttgatgatc gcgtgactgg gaaaatcgag gcctttgcaa 1680

gcaggtccaa gattgtgcac attgacattg acccagctga gattggcaag aacaagcagc 1740

cacatgtctc catttgtgca gatgttaagc ttgctttaca ggggttgaat gctctattaa 1800

atgggagcaa agcacaacag ggtctggatt ttggtccatg gcacaaggag ttggatcagc 1860

agaagaggga gtttcctcta ggattcaaga cttttggcga ggccatcccg ccgcaatatg 1920

ctatccaggt actggatgag ctgacaaaag gggaggcgat cattgctact ggtgttgggc 1980

agcaccagat gtgggcggct cagtattaca cttacaagcg gccacggcag tggctgtctt 2040

cgtctggttg ggggcaatgg gatttgggtt accagctgca gctggcgctg ctgtggccaa 2100

cccaggtgtt acagttgttg acattgatgg agatggtagt ttcctcatga acattcagga 2160

gttggcattg atccgtattg agaacctccc tgtgaaggtg atgatattga acaaccagca 2220

tctgggaatg gtggtgcaat gggaggatag gttttacaag gccaatcggg cgcacacata 2280

ccttggcaac ccagaaaatg agagtgagat atatccagat tttgtgacga ttgctaaagg 2340

attcaacgtt ccggcagttc gtgtgacgaa gaagagcgaa gtcactgcag caatcaagaa 2400

gatgcttgag accccagggc catacttgtt ggatatcatc gtcccgcatc aggagcacgt 2460

gctgcctatg atcccaagcg gtggtgcttt caaggacatg atcatggagg gtgatggcag 2520

gacctcgtac tgaaatttcg acctacaaga cctacaagtg tgacatgcgc aatcagcatg 2580

gtgcccgcgt gttgtatcaa ctactagggg ttcaactgtg aaccatgcgt tttctagttt 2640

gcttgtttca ttcatataag cttgtgttac ttagttccga accctgtagc tttgtagtct 2700

atgctctctt ttgtagggat gtgctgtcat aagatatcat gcaagtttct tgtcctacat 2760

atcaataata agtacttcca tggaataatt ctcagttctg ttttgaattt tgcatcttct 2820

cacaaacagt gtgctggttc ctttctgtta ctttacatgt ctgccgtgtc cggttatgac 2880

ataatgaccg atggagggtg gtcagcaggt tttagacggg gagttgaaac tttttttggg 2940

ggggaagaaa tctgaataca gttgggagga aagataaaag catatacctt gattaattta 3000

ttgagcccaa tatccagcct aatttatcaa gcaataggca gtgtagggtg ttg 3053

<210> 26
<211> 3589
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Копія гомологічного гена AHAS з субгеному B

<400> 26
cgttcgcccg tagaccattc ctacgaatcg gtaccggaga gacatagggg ctgtatggtt 60

cctaaccata ccttgccaca ctttgtcaca cctcatctta ggcaaattta atcaagttat 120

gtaggtgttt ggttttagcc acatctaagg caagatttat tttcctgagc agtgaacccc 180

atatgttata gacataaaaa gtgtgggaag attcccttta gtcaaactgt ggctaacaat 240

ttattaagaa ttaacttaag taagataggt gcaacaaatg tagcaaaaat aatgtggtat 300

atatagcaaa gatagccaca accgcgagtg gaaataccag atacgagatc tctggtcata 360

tcacacgagt ccaaattaat tgctttgttt gaggttcagc ctttttgcat aaaaaagcta 420

gcccaaacaa acgagtggcg tcccatctga accacacact cacccgccgc gtgacagcgc 480

caaagacaaa accatcaccc ctccccaatt ccaaccctct ctctgcctca cagaaatctc 540

tccctcgccc aaaccctcgc cgccgccatg gccgcagcca cctcccccgc cgtcgcattc
600

tcgggcgccg ccgccgccgc cgccgccata cccaaacccg cccgccagcc tctcccgcgc
660

caccagcccg cctcgcgccg cgcgctcccc gcccgcatcg tcaggtgctg cgccgcgtcc
720

cccgccgcca cctccgtcgc gcctcccgcc accgcgctcc ggccgtgggg cccctccgag
780

ccccgcaagg gcgccgacat cctcgtcgag gcgctggagc gctgcggcat cgtcgacgtc
840

ttcgcctacc ctggcggcgc gtccatggag atccaccagg cgctgacgcg ctcgccagtc
900

atcaccaacc acctcttccg ccacgagcag ggggaggcgt tcgcggcgtc cgggtacgcc
960

cgcgcgtccg gccgcgtcgg cgtctgcgtc gccacctccg gcccgggggc caccaacctc
1020

gtctccgcgc tcgccgacgc tctcctcgac tccatcccca tggtcgccat cacgggccag
1080

gtcccccgcc gcatgatcgg cacggatgcg ttccaggaga cgcccatcgt ggaggtcacg
1140

cgctccatca ccaagcacaa ctacctggtc cttgacgtgg aggatatccc ccgcgtcatc
1200

caggaagcct tcttcctcgc atcctctggc cgcccggggc cggtgctggt tgatatcccc
1260

aaggacatcc agcagcagat ggctgtgcct gtctgggaca cgccgatgag tttgccaggg
1320

tacatcgccc gcctgcccaa gccaccatct actgaatcgc ttgagcaggt cctgcgtctg
1380

gttggcgagt cacggcgccc aattctgtat gttggtggtg gctgcgctgc atctggtgag
1440

gagttgcgcc gctttgttga gctcactggg attccagtta caactactct tatgggcctt
1500

ggcaacttcc ccagtgacga cccactgtct ctgcgcatgc tggggatgca tggcactgtg
1560

tatgcaaatt atgcagtaga taaggctgac ctgttgcttg catttggtgt gcggtttgat
1620

gatcgtgtga ccgggaaaat cgaggctttt gcaagcaggt ccaagattgt gcacattgac
1680

attgacccag ctgagattgg caagaacaag cagccacatg tctccatttg tgcagatgtt 1740

aagcttgctt tacaggggtt gaatgctcta ttaaatggga gcaaagcaca acagggtctg 1800

gattttggtc catggcacaa ggagttggat cagcagaaga gggagtttcc tctaggattc 1860

aagacttttg gtgaggccat cccgccgcaa tatgctatcc aggtactgga tgagctgaca 1920

aaaggggagg cgatcattgc caccggtgtt gggcagcatc agatgtgggc ggctcagtat 1980

tacacttaca agcggccacg gcagtggctg tcttcatccg gtttgggtgc aatgggattt 2040

gggttgccag ctgcagctgg cgctgctgtg gccaacccag gtgttacagt tgttgacatt 2100

gatggggatg gtagtttcct catgaacatt caggagttgg cgttgatccg tattgagaac 2160

ctcccagtga aggtgatgat attgaacaac cagcatctgg gaatggtggt gcagtgggag 2220

gataggtttt acaaggccaa ccgggcgcac acataccttg gcaacccaga aaatgagagt 2280

gagatatatc cagattttgt gacgattgct aaaggattca acgttccggc agttcgtgtg 2340

acgaagaaga gcgaagtcac tgcagcaatc aagaagatgc ttgagacccc agggccatac 2400

ttgttggata tcattgtccc gcatcaggag cacgtgctgc ctatgatccc aagcggtggt 2460

gcttttaagg acatgatcat ggagggtgat ggcaggacct cgtactgaaa tttcgaccta 2520

caagacctac aagtgtgaca tgcgcaatca gcatgatacc tgcgtgttgt atcaactact 2580

gggggttcaa ctgtgaacca tgcgttttct agtttgcttg tttcattcat ataagcttgt 2640

gttacttagt tccgaaccgt gtagttttgt agtctctgtt ctcttttgta gggatgtgct 2700

gtcataagat atcatgcaag tttcttgtcc tacatatcaa taataagcac ttccatggaa 2760

taattctcag ttctgttttg aatttcacat cttctcacga acagtgtgct ggttcctttc
2820

tgttacttta catgcctgcc gtgtcaggtt atgacataac gaccgatgga ggattggagg
2880

gtggtcggct ggttttagac ggggaattga aacatttttc tggaagaaat ctgaatacag
2940

ttgggagggg aaatggaagc atatatttat cgagcccgct atccaggcta atttatcaag
3000

cactagacag tgtagggtgt tggcattctt ctcttccttg atatccggct tgagaggaga
3060

gattgaggct tcggctgtgt tggttgctga tttctacagc attttgagag agagagagag
3120

atgttgcaac tgtgttttgt cttggttgct tgtacagaga aagagatgac atttagagat
3180

atgcagatcg tttaccagtt gtgctgcgtt tattcgtact gattgttgtt attgttgcta
3240

tcatgtgcaa attgttgtga tggaaaatca acaaaatttt gatattttgc aaagcgagtt
3300

ggattgaatg atttgagaaa tggtgacttg ttgagtggcc ttgagaattg gtgtttcata
3360

ggtgtgcagt tggtaatgaa aggcggcggc ttgaaatttc cgaaaggcag gcaatgatac
3420

tttctgaaag tgatgttttt tcttccaggt ttccggtgga acaagtctac gttgagccaa
3480

tgtttgtcag cttattctgc tctttagttt cagttgtttt gttcacagat tgctgggcag
3540

agccccatga tcggctgagc ctccaggaga tccttgattg ctcgactgc
3589

<210> 27
<211> 3599
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Копія гомологічного гена AHAS з субгеному D

<400> 27
cgttcgcccg tagaccattc atacgaatcg gtaccggaga gacatagggg ctatttggtt
60

tgtagccaca ttttgtcata ctttgtgaca ccgcatctta tgcaagtttg atcaaattag 120

gtggatgttt agttctaacc acatgtaagg gaagattttt ttttttatga gcattgaacc 180

cgtagacaca aaaagtgtag gaagattact ttaaacaagc taaagtgtgg ctaacaattt 240

aagcatctca ggtaagataa gtgcgacaaa tatggcaaaa ataatgtggt atatatgaca 300

aagatagtca caatccaaac agcccatagc ctggcgagtg caaatagata cgagatctct 360

ggtgatatca caaccgtcca aattaattgc ttgtttcagc atcagccttt ttgcataaag 420

aagctagccc aatctgaacc acacactcac ccgccgcgtg acagcgccaa agacaaaacc 480

atcacccctc cccaattcca accctctctc tgcctcacag aaatctcccc cctcgcccaa 540

accctcgccg ccgccatggc cgccgccacc tcccccgccg tcgcattctc gggcgccacc 600

gccgccgcca tgcccaaacc cgcccgccat cctctcccgc gccaccagcc cgtctcgcgc 660

cgcgcgctcc ccgcccgcgt cgtcaggtgt tgcgccgcgt cccccgccgc cacctccgcc 720

gcgcctcccg caaccgcgct ccggccctgg ggcccgtccg agccccgcaa gggcgccgac 780

atcctcgtcg aggcgctcga gcgctgcggc atcgtcgacg tcttcgccta ccccggcggc 840

gcctccatgg agatccacca ggcgctgacg cgctcgcccg tcatcaccaa ccacctcttc 900

cgccacgagc agggggaggc gttcgcggcg tccggctacg cccgcgcgtc cggccgcgtc 960

ggcgtctgcg tcgccacctc cggcccgggg gccaccaacc tcgtctccgc gctcgccgac 1020

gccctcctcg actccatccc catggtcgcc atcacgggcc aggtcccccg ccgcatgatc 1080

ggcacggacg cgttccagga gacgcccata gtggaggtca cgcgctccat caccaagcac 1140

aactacctgg tccttgacgt ggaggatatc ccccgcgtca tccaggaagc cttcttcctt 1200

gcatcctctg gccgcccggg gccggtgcta gttgatatcc ccaaggacat ccagcagcag 1260

atggctgtgc ccgtctggga cactccaatg agtttgccag ggtacatcgc ccgcctgccc 1320

aagccaccat ctactgaatc gcttgagcag gtcctgcgtc tggttggcga gtcacggcgc 1380

ccaattctgt atgttggtgg tggctgcgct gcgtctggcg aggagttgcg ccgctttgtt 1440

gagcttactg ggattccagt tacaactact ctgatgggcc ttggcaactt ccccagcgac 1500

gacccactgt ctctgcgcat gcttgggatg catggcactg tgtatgcaaa ttatgcagta 1560

gataaggctg acctgttgct cgcatttggt gtgcggtttg atgatcgtgt gactgggaaa 1620

atcgaggctt ttgcaagcag gtccaagatt gtgcacattg acattgaccc agctgagatt 1680

ggcaagaaca agcagccaca tgtctccatt tgtgcagatg ttaagcttgc tttacagggg 1740

ttgaatgatc tattaaatgg gagcaaagca caacagggtc tggattttgg tccatggcac 1800

aaggagttgg atcagcagaa gagggagttt cctctaggat tcaagacttt tggcgaggcc 1860

atcccgccgc aatatgctat ccaggtactg gatgagctga caaaagggga ggcgatcatt 1920

gccactggtg ttgggcagca ccagatgtgg gcggctcagt attacactta caagcggcca 1980

cggcagtggc tgtcttcgtc tggtttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct 2040

ggcgctgctg tggccaaccc aggtgttaca gttgttgaca ttgatggtga tggtagtttc 2100

ctcatgaaca ttcaggagtt ggcgttgatc cgcattgaga acctcccagt gaaggtgatg 2160

atattgaaca accagcatct gggaatggtg gtgcagtggg aggataggtt ttacaaggcc 2220

aatcgggcgc acacatacct tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt 2280

gtgacgattg ctaaaggatt caacgttcca gcagttcgag tgacgaagaa gagcgaagtc 2340

actgcagcaa tcaagaagat gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatagtc 2400

ccgcatcagg agcacgtgct gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc 2460

atggagggtg atggcaggac ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga 2520

catgcgcaat cagcatgatg cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgagc 2580

catgcgtttt ctagtttgct tgtttcattc atataagctt gtattactta gttccgaacc 2640

ctgtagtttt gtagtctatg ttctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atgtcatgca 2700

agtttcttgt cctacatatc aataataagt acttccatgg aataattctc agttctgttt 2760

tgaattttgc atcttctcac aaacagtgtg ctggttcctt tctgttactt tacatgtctg 2820

ctgtgtcagg ttctgacata acgaccgatg gagggtggtc ggcaggtttt agaaggggaa 2880

ttgaaacttt tttttgggaa gaagtctgaa tacagttggg aggaaaaata gaagtatata 2940

cttcgattaa tttatcaagc ccgctatcca gtctaattta tcaagcacta gacagtgtag 3000

ggtgttggca ttcttctctt ccttgagatc cggcttgaga ggagagaccg aggcttcggc 3060

tgtgttggtt gctgatttct acagcttttt gagatagaga gagagatcct gcaactgtgg 3120

tttgtcttgc tgcttgtaca gcgagagaga cattgagaga tatgtagatc gtttaccagt 3180

tgtgctgctg ttattcgtac tggtactgat tgttgttact gttgctatca tgtgcaaatt 3240

gttgtgatgg aaaatcaaca aaattttgat attttgcaaa gcgagttgga ttgaatgatt 3300

tgagaaatgg tgactgcttt ccctcagact tgttgagtgg ccttgagaat tggtgtttca 3360

taggtggtgt atgcagttgc taatgaaagg cgacggcttg aaatttccga aaggcagcca 3420

atgatacttt ctgaaagtga tgtttttttc gtccaggttt ccggtggagc aagtctagac 3480

acacgttgag ccaatgtttg tcagcttatt ctgctcttta gtttcagttt aggtgcagtt 3540

gttttgttta cagattgctg ggcagagccc cgtgatcggc tgagcctcca agagatcct 3599

<210> 28
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 28

Asp Ser Thr Asn Arg Tyr Arg
1 5

<210> 29
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 29

Gln Ser Ala His Arg Thr Asn
1 5

<210> 30
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 30

Arg Asn Asp His Arg Ile Asn
1 5

<210> 31
<211> 7
<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 31

Arg Ser Asp Val Leu Ser Ala
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 32

His Asn Ser Ser Leu Lys Asp
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 33

Gln Trp Gly Thr Arg Tyr Arg
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 34

Gln Arg Ser Asn Leu Asp Ser
1 5

<210> 35
<211> 28
<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 35
ggatagcata ttgcggcggg atggcctc
28

<210> 36
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 36
gtactggatg agctgacaaa aggggagg
28

<210> 37
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 37
gtacctggat agcatattgc ggcgggat
28

<210> 38
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 38
agtacctgga tagcatattg cggcggga
28

<210> 39
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 39
gatgagctga caaaagggga ggcgatca
28

<210> 40
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 40
atgagctgac aaaaggggag gcgatcat
28

<210> 41
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 41
tcatccagta cctggatagc atattgcg
28

<210> 42
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 42
ctgacaaaag gggaggcgat cattgcca
28

<210> 43
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 43
aggcagcacg tgctcctgat gcgggact
28

<210> 44
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 44
taggcagcac gtgctcctga tgcgggac
28

<210> 45
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 45
gatcccaagc ggtggtgctt tcaaggac
28

<210> 46
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 46
tgatgcggga ctatgatatc caacaagt
28

<210> 47
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 47
gagcacgtgc tgcctatgat cccaagcg
28

<210> 48
<211> 28

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 48
tcttgtaggt cgaaatttca gtacgagg
28

<210> 49
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 49
ctacaagtgt gacatgcgca atcagcat
28

<210> 50
<211> 14
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 50
cttgtaggtc gaaa
14

<210> 51
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 51
caagtgtgac atgcgcaa
18

<210> 52
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 52
tcttgtaggt cgaaatttca gtacgagg
28

<210> 53
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 53
tcttgtaggt cgaaatttca gtacgagg
28

<210> 54
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 54
tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatg
28

<210> 55
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 55
cagaacctga cacagcagac atgtaaag
28

<210> 56
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 56

ataacgaccg atggagggtg gtcggcag
28

<210> 57
<211> 59
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(58)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 57
ancactcttt ccctacacga cgctcttccg atcttcctct aggattcaag acttttgng
59

<210> 58
<211> 57
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (56)..(56)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 58
gntgactgga gttcagacgt gtgctcttcc gatctcgtgg ccgcttgtaa gtgtana
57

<210> 59
<211> 56
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(55)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 59
ancactcttt ccctacacga cgctcttccg atctgagacc ccagggccat acttng
56

<210> 60
<211> 59
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(58)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 60
gntgactgga gttcagacgt gtgctcttcc gatctcaagc aaactagaaa acgcatgng
59

<210> 61
<211> 55
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)

<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(54)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 61
ancactcttt ccctacacga cgctcttccg atctatggag ggtgatggca gganc
55

<210> 62
<211> 60
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(59)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 62
gntgactgga gttcagacgt gtgctcttcc gatctatgac agcacatccc tacaaaagna
60

<210> 63
<211> 58
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)..(57)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 63

ancactcttt ccctacacga cgctcttccg atctaacagt gtgctggttc ctttctng
58

<210> 64
<211> 60
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(59)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 64
gntgactgga gttcagacgt gtgctcttcc gatcttytyy cctcccaact gtattcagna
60

<210> 65
<211> 1380
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000132

<400> 65
tgcaagcagg tccaagattg tgcacattga cattgaccca gctgagattg gcaagaacaa
60

gcagccacat gtctccattt gtgcagatgt taagcttgct ttacaggggt tgaatgctct
120

attaaatggg agcaaagcac aacagggtct ggattttggt ccatggcaca aggagttgga
180

tcagcagaag agggagtttc ctctaggatt caagactttt ggcgaggcca tcccgccgca
240

atatgctatc caggtactgg atgagctgac aaaaggggag gcgatcattg ctactggtgt
300

tgggcagcac cagatgtggg cggctcagta ttacacttac aagcggccac ggcagtggct
360

gtcttcgtct ggttgggggc aatgggattt gggttaccag ctgcagctgg cgctgctgtg
420

gccaacccag gtgttacagt tgttgacatt gatggagatg gtagtttcct catgaacatt
480

caggagttgg cattgatccg tattgagaac ctccctgtga aggtgatgat attgaacaac
540

cagcatctgg gaatggtggt gcaatgggag gataggtttt acaaggccaa tcgggcgcac
600

acataccttg gcaacccaga aaatgagagt gagatatatc cagattttgt gacgattgct
660

aaaggattca acgttccggc agttcgtgtg acgaagaaga gcgaagtcac tgcagcaatc
720

aagaagatgc ttgagacccc agggccatac ttgttggata tcatcgtccc gcatcaggag
780

cacgtgctgc ctatgatccc aaatggtggt gctttcaagg acatgatcat ggagggtgat
840

ggcaggacct cgtactgaaa tttcgaccta caagacctac aagtgtgaca tgcgcaatca
900

gcatggtgcc cgcgtgttgt atcaactact aggggttcaa ctgtgaacca tgcgttttct
960

agtttgcttg tttcattcat ataagcttgt gttacttagt tccgaaccct gtagctttgt
1020

agtctatgct ctcttttgta gggatgtgct gtcataagat atcatgcaag tttcttgtcc
1080

tacatatcaa taataagtac ttccatggaa taattctcag ttctgttttg aattttgcat
1140

cttctcacaa acagtgtgct ggttcctttc tgttacttta catgtctgcc gtgtccggtt
1200

atgacataat gaccgatgga gggtggtcag caggttttag acggggagtt gaaacttttt
1260

tttgggggga agaaatctga atacagttgg gaggaaagat aaaagcatat accttgatta
1320

atttattgag cccaatatcc agcctaattt atcaagcaat aggcagtgta gggtgttggc
1380

<210> 66
<211> 1572
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000133

<400> 66
tgcaagcagg tccaagattg tgcacattga cattgaccca gctgagattg gcaagaacaa 60

gcagccacat gtctccattt gtgcagatgt taagcttgct ttacaggggt tgaatgctct 120

attaaatggg agcaaagcac aacagggtct ggattttggt ccatggcaca aggagttgga 180

tcagcagaag agggagtttc ctctaggatt caagactttt ggtgaggcca tcccgccgca 240

atatgctatc caggtactgg atgagctgac aaaaggggag gcgatcattg ccaccggtgt 300

tgggcagcat cagatgtggg cggctcagta ttacacttac aagcggccac ggcagtggct 360

gtcttcatcc ggtttgggtg caatgggatt tgggttgcca gctgcagctg gcgctgctgt 420

ggccaaccca ggtgttacag ttgttgacat tgatggggat ggtagtttcc tcatgaacat 480

tcaggagttg gcgttgatcc gtattgagaa cctcccagtg aaggtgatga tattgaacaa 540

ccagcatctg ggaatggtgg tgcagtggga ggataggttt tacaaggcca accgggcgca 600

cacatacctt ggcaacccag aaaatgagag tgagatatat ccagattttg tgacgattgc 660

taaaggattc aacgttccgg cagttcgtgt gacgaagaag agcgaagtca ctgcagcaat 720

caagaagatg cttgagaccc cagggccata cttgttggat atcattgtcc cgcatcagga 780

gcacgtgctg cctatgatcc caaatggtgg tgcttttaag gacatgatca tggagggtga 840

tggcaggacc tcgtactgaa atttcgacct acaagaccta caagtgtgac atgcgcaatc 900

agcatgatac ctgcgtgttg tatcaactac tgggggttca actgtgaacc atgcgttttc 960

tagtttgctt gtttcattca tataagcttg tgttacttag ttccgaaccg tgtagttttg 1020

tagtctctgt tctcttttgt agggatgtgc tgtcataaga tatcatgcaa gtttcttgtc
1080

ctacatatca ataataagca cttccatgga ataattctca gttctgtttt gaatttcaca
1140

tcttctcacg aacagtgtgc tggttccttt ctgttacttt acatgcctgc cgtgtcaggt
1200

tatgacataa cgaccgatgg aggattggag ggtggtcggc tggttttaga cggggaattg
1260

aaacattttt ctggaagaaa tctgaataca gttgggaggg gaaatggaag catatattta
1320

tcgagcccgc tatccaggct aatttatcaa gcactagaca gtgtagggtg ttggcattct
1380

tctcttcctt gatatccggc ttgagaggag agattgaggc ttcggctgtg ttggttgctg
1440

atttctacag cattttgaga gagagagaga gatgttgcaa ctgtgttttg tcttggttgc
1500

ttgtacagag aaagagatga catttagaga tatgcagatc gtttaccagt tgtgctgcgt
1560

ttattcgtac tg
1572

<210> 67
<211> 1571
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000134

<400> 67
tgcaagcagg tccaagattg tgcacattga cattgaccca gctgagattg gcaagaacaa
60

gcagccacat gtctccattt gtgcagatgt taagcttgct ttacaggggt tgaatgatct
120

attaaatggg agcaaagcac aacagggtct ggattttggt ccatggcaca aggagttgga
180

tcagcagaag agggagtttc ctctaggatt caagactttt ggcgaggcca tcccgccgca
240

atatgctatc caggtactgg atgagctgac aaaaggggag gcgatcattg ccactggtgt
300

tgggcagcac cagatgtggg cggctcagta ttacacttac aagcggccac ggcagtggct 360

gtcttcgtct ggtttggggg caatgggatt tgggttacca gctgcagctg gcgctgctgt 420

ggccaaccca ggtgttacag ttgttgacat tgatggtgat ggtagtttcc tcatgaacat 480

tcaggagttg gcgttgatcc gcattgagaa cctcccagtg aaggtgatga tattgaacaa 540

ccagcatctg ggaatggtgg tgcagtggga ggataggttt tacaaggcca atcgggcgca 600

cacatacctt ggcaacccag aaaatgagag tgagatatat ccagattttg tgacgattgc 660

taaaggattc aacgttccag cagttcgagt gacgaagaag agcgaagtca ctgcagcaat 720

caagaagatg cttgagaccc cagggccata cttgttggat atcatagtcc cgcatcagga 780

gcacgtgctg cctatgatcc caatcggtgg tgctttcaag gacatgatca tggagggtga 840

tggcaggacc tcgtactgaa atttcgacct acaagaccta caagtgtgac atgcgcaatc 900

agcatgatgc ccgcgtgttg tatcaactac taggggttca actgtgagcc atgcgttttc 960

tagtttgctt gtttcattca tataagcttg tattacttag ttccgaaccc tgtagttttg 1020

tagtctatgt tctcttttgt agggatgtgc tgtcataaga tgtcatgcaa gtttcttgtc 1080

ctacatatca ataataagta cttccatgga ataattctca gttctgtttt gaattttgca 1140

tcttctcaca aacagtgtgc tggttccttt ctgttacttt acatgtctgc tgtgtcaggt 1200

tctgacataa cgaccgatgg agggtggtcg gcaggtttta gaaggggaat tgaaactttt 1260

ttttgggaag aagtctgaat acagttggga ggaaaaatag aagtatatac ttcgattaat 1320

ttatcaagcc cgctatccag tctaatttat caagcactag acagtgtagg gtgttggcat 1380

tcttctcttc cttgagatcc ggcttgagag gagagaccga ggcttcggct gtgttggttg 1440

ctgatttcta cagctttttg agatagagag agagatcctg caactgtggt ttgtcttgct 1500

gcttgtacag cgagagagac attgagagat atgtagatcg tttaccagtt gtgctgctgt 1560

tattcgtact g
1571

<210> 68
<211> 1571
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000135

<400> 68
tgcaagcagg tccaagattg tgcacattga cattgaccca gctgagattg gcaagaacaa 60

gcagccacat gtctccattt gtgcagatgt taagcttgct ttacaggggt tgaatgatct 120

attaaatggg agcaaagcac aacagggtct ggattttggt ccatggcaca aggagttgga 180

tcagcagaag agggagtttc ctctaggatt caagactttt ggcgaggcca tcccgccgca 240

atatgctatc caggtactgg atgagctgac aaaaggggag gcgatcattg ccactggtgt 300

tgggcagcac cagatgtggg cggctcagta ttacacttac aagcggccac ggcagtggct 360

gtcttcgtct ggtttggggg caatgggatt tgggttacca gctgcagctg gcgctgctgt 420

ggccaaccca ggtgttacag ttgttgacat tgatggtgat ggtagtttcc tcatgaacat 480

tcaggagttg gcgttgatcc gcattgagaa cctcccagtg aaggtgatga tattgaacaa 540

ccagcatctg ggaatggtgg tgcagtggga ggataggttt tacaaggcca atcgggcgca 600

cacatacctt ggcaacccag aaaatgagag tgagatatat ccagattttg tgacgattgc 660

taaaggattc aacgttccag cagttcgagt gacgaagaag agcgaagtca ctgcagcaat 720

caagaagatg cttgagaccc cagggccata cttgttggat atcatagtcc cgcatcagga
780

gcacgtgatg cctatgatcc caaatggtgg tgctttcaaa gacatgatca tggagggtga
840

tggcaggacc tcgtactgaa atttcgacct acaagaccta caagtgtgac atgcgcaatc
900

agcatgatgc ccgcgtgttg tatcaactac taggggttca actgtgagcc atgcgttttc
960

tagtttgctt gtttcattca tataagcttg tattacttag ttccgaaccc tgtagttttg
1020

tagtctatgt tctcttttgt agggatgtgc tgtcataaga tgtcatgcaa gtttcttgtc
1080

ctacatatca ataataagta cttccatgga ataattctca gttctgtttt gaattttgca
1140

tcttctcaca aacagtgtgc tggttccttt ctgttacttt acatgtctgc tgtgtcaggt
1200

tctgacataa cgaccgatgg agggtggtcg gcaggtttta gaaggggaat tgaaactttt
1260

ttttgggaag aagtctgaat acagttggga ggaaaaatag aagtatatac ttcgattaat
1320

ttatcaagcc cgctatccag tctaatttat caagcactag acagtgtagg gtgttggcat
1380

tcttctcttc cttgagatcc ggcttgagag gagagaccga ggcttcggct gtgttggttg
1440

ctgatttcta cagctttttg agatagagag agagatcctg caactgtggt ttgtcttgct
1500

gcttgtacag cgagagagac attgagagat atgtagatcg tttaccagtt gtgctgctgt
1560

tattcgtact g
1571

<210> 69
<211> 1573
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000131

<400> 69

tgcaagcagg tccaagattg tgcacattga cattgaccca gctgagattg gcaagaacaa 60

gcagccacat gtctccattt gtgcagatgt taagcttgct ttacaggggt tgaatgatct 120

attaaatggg agcaaagcac aacagggtct ggattttggt ccatggcaca aggagttgga 180

tcagcagaag agggagtttc ctctaggatt caagactttt ggcgaggcca tcccgccgca 240

atatgctatc caggtactgg atgagctgac aaaaggggag gcgatcattg ccactggtgt 300

tgggcagcac cagatgtggg cggctcagta ttacacttac aagcggccac ggcagtggct 360

gtcttcgtct ggtttggggg caatgggatt tgggttacca gctgcagctg gcgctgctgt 420

ggccaaccca ggtgttacag ttgttgacat tgatggtgat ggtagtttcc tcatgaacat 480

tcaggagttg gcgttgatcc gcattgagaa cctcccagtg aaggtgatga tattgaacaa 540

ccagcatctg ggaatggtgg tgcagtggga ggataggttt tacaaggcca atcgggcgca 600

cacatacctt ggcaacccag aaaatgagag tgagatatat ccagattttg tgacgattgc 660

taaaggattc aacgttccag cagttcgagt gacgaagaag agcgaagtca ctgcagcaat 720

caagaagatg cttgagaccc cagggccata cttgttggat atcatagtcc cgcatcagga 780

gcacgtgctg ccgaattcat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt 840

gatggcagga cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa 900

tcagcatgat gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt 960

tctagtttgc ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt 1020

tgtagtctat gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg 1080

tcctacatat caataataag tacttccatg gaataattct cagttctgtt ttgaattttg 1140

catcttctca caaacagtgt gctggttcct ttctgttact ttacatgtct gctgtgtcag
1200

gttctgacat aacgaccgat ggagggtggt cggcaggttt tagaagggga attgaaactt
1260

ttttttggga agaagtctga atacagttgg gaggaaaaat agaagtatat acttcgatta
1320

atttatcaag cccgctatcc agtctaattt atcaagcact agacagtgta gggtgttggc
1380

attcttctct tccttgagat ccggcttgag aggagagacc gaggcttcgg ctgtgttggt
1440

tgctgatttc tacagctttt tgagatagag agagagatcc tgcaactgtg gtttgtcttg
1500

ctgcttgtac agcgagagag acattgagag atatgtagat cgtttaccag ttgtgctgct
1560

gttattcgta ctg
1573

<210> 70
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 70
tgagcctctc gtcgccgatc acat
24

<210> 71
<211> 1159
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000433

<400> 71
ccactcttgc cctacacgac actgaagacc ttatgattcc aaacggcggc gccttcaagg
60

acatgatcat ggagggtgat ggcaggacct cgtactgaaa tttcgaccta caagacctac
120

aagtgtgaca tgcgcaatca gcatggtgcc cgcgtgttgt atcaactact aggggttcaa
180

ctgtgaacca tgcgttttct agtttgcttg tttcattcat ataagcttgt gttacttagt
240

tccgaaccct gtagctttgt agtctatgct ctcttttgta gggatgtgct gtcataagat
300

atcatgcaag tttcttgtcc tacatatcaa taataagtac ttccatggaa taattctcag
360

ttctgttttg aattttgcat cttctcacaa acagtgtgct ggttcctttc tgttcgctga
420

cgccctcctc gactccatcc ccatggtcgc catcacgggc caggtccccc gccgcatgat
480

cggtagcgac ttcgtgggcg aggaaagcct ttcgtccaag gtggtccctc ctcgcaatct
540

tgttggatgg tgaatattat aaaagcctgc ccttctcgcg ggtaagactc ccgcccatcc
600

aggatgagga tgaccagcct tttgcagttt atccactagg gacaggattg catcctgccg
660

aaaccctgcc aagcttgagg tagcctccaa tttgacggtg ccgccagcga cgccgtctgg
720

aactgtcctt tttgaggacc actccgtttg tctagaggta cctggagatc atgacattaa
780

ggatgaccag ttcgtaaagg tcctgcggtg tctattgctt ttcataggtt aataagtgtt
840

tgctagactg tggtgaaagg ccaagactcc cgcccatctc tctatgcccg ggacaagtgc
900

caccccacag tggggcagga tgaggatgac caaagactcc cgcccatctc actagggaca
960

ggattggcct tttgcagttt atctctatgc ccgggacaag tgtatccgaa gtaaataaaa
1020

ccatcggact ctcgtataag actgtcgact cgaccggccg acgcataggt tcatttgaag
1080

ctgctattct atttaaattg aaactcggac ggtagcagtg tggtatgagg tcttcagcac
1140

actcggtaac tccagtcac
1159

<210> 72
<211> 2479
<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000434

<400> 72
ccactcttgc cctacacgac actgaagacg tcgccattac cgggcaagtg acccgccgca 60

tgatcggcac ggacgcgttc caggagacgc ccatagtgga ggtcacgcgc tccatcacca 120

agcacaacta cctggtcctt gacgtggagg atatcccccg cgtcatccag gaagccttct 180

tccttgcatc ctctggccgc ccggggccgg tgctagttga tatccccaag gacatccagc 240

agcagatggc tgtgcccgtc tgggacactc caatgagttt gccagggtac atcgcccgcc 300

tgcccaagcc accatctact gaatcgcttg agcaggtcct gcgtctggtt ggcgagtcac 360

ggcgcccaat tctgtatgtt ggtggtggct gcgctgcgtc tggcgaggag ttgcgccgct 420

ttgttgagct tactgggatt ccagttacaa ctactctgat gggccttggc aacttcccca 480

gcgacgaccc actgtctctg cgcatgcttg ggatgcatgg cactgtgtat gcaaattatg 540

cagtagataa ggctgacctg ttgctcgcat ttggtgtgcg gtttgatgat cgtgtgactg 600

ggaaaatcga ggcttttgca agcaggtcca agattgtgca cattgacatt gacccagctg 660

agattggcaa gaacaagcag ccacatgtct ccatttgtgc agatgttaag cttgctttac 720

aggggttgaa tgatctatta aatgggagca aagcacaaca gggtctggat tttggtccat 780

ggcacaagga gttggatcag cagaagaggg agtttcctct aggattcaag acttttggcg 840

aggccatccc gccgcaatat gctatccagg tactggatga gctgacaaaa ggggaggcga 900

tcattgccac tggtgttggg cagcaccaga tgtgggcggc tcagtattac acttacaagc 960

ggccacggca gtggctgtct tcgtctggtt tgggggcaat gggatttggg ttaccagctg 1020

cagctggcgc tgctgtggcc aacccaggtg ttacagttgt tgacattgat ggtgatggta 1080

gtttcctcat gaacattcag gagttggcgt tgatccgcat tgagaacctc ccagtgaagg 1140

tgatgatatt gaacaaccag catctgggaa tggtggtgca gtgggaggat aggttttaca 1200

aggccaatcg ggcgcacaca taccttggca acccagaaaa tgagagtgag atatatccag 1260

attttgtgac gattgctaaa ggattcaacg ttccagcagt tcgagtgacg aagaagagcg 1320

aagtcactgc agcaatcaag aagatgcttg agaccccagg gccatacttg ttggatatca 1380

tagtcccgca tcaggagcac gtgctgccta tgatcccaag cggtggtgct ttcaaggaca 1440

tgatcatgga gggtgatggc aggacctcgt actgaaattt cgacctacaa gacctacaag 1500

tgtgacatgc gcaatcagca tggtgcccgc gtgttgtatc aactactagg ggttcaactg 1560

tgaaccatgc gttttctagt ttgcttgttt cattcatata agcttgtgtt acttagttcc 1620

gaaccctgta gctttgtagt ctatgctctc ttttgtaggg atgtgctgtc ataagatatc 1680

atgcaagttt cttgtcctac atatcaataa taagtacttc catggaataa ttctcagttc 1740

tgttttgaat tttgcatctt ctcacaaaca gtgtgctggt tcctttctgt tctacgcccg 1800

cgcgtccggc cgcgtcggcg tctgcgtcgc cacctccggc ccgggggcca ccaacctcgt 1860

ctccgtagcg acttcgtggg cgaggaaagc ctttcgtcca aggtggtccc tcctcgcaat 1920

cttgttggat ggtgaatatt ataaaagcct gcccttctcg cgggtgagtc catgctcaac 1980

accgtgcact agggacagga ttggcctttt gcagtttatc cactagggac aggattgcat 2040

cctgccgaaa ccctgccaag cttgaggtag cctccaattt gacggtgccg ccagcgacgc 2100

cgtctggaac tgtccttttt gaggaccact ccgtttgtct agaggtacct ggagatcatg
2160

acattaagga tgaccagttc gtaaaggtcc tgcggtgtct attgcttttc ataggttaat
2220

aagtgtttgc tagactgtgg tgaaaggccg ccttttgcag tttatctcta gaaagactgg
2280

agttgcagaa agactcccgc ccatccagga tgaggatgac catatccgaa gtaaataaaa
2340

ccatcggact ctcgtataag actgtcgact cgaccggccg acgcataggt tcatttgaag
2400

ctgctattct atttaaattg aaactcggac ggtagcagtg tggtatgagg tcttcagcac
2460

actcggtaac tccagtcac
2479

<210> 73
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 73

Gln Gln Trp Asp Arg Lys Gln
1 5

<210> 74
<211> 47
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000152

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 74

tnantggtta ggtgctggtg gtccgaaggt ccacgccgcc aactacg
47

<210> 75
<211> 47
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000152

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 75
cnantacgta gttggcggcg tggaccttcg gaccaccagc acctaac
47

<210> 76
<211> 47
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000149

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 76
tnantggtta ggtgctggtg gtccgaaggt ccacgccgcc aactacg
47

<210> 77
<211> 47
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000149

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 77
angngtcgta gttggcggcg tggaccttcg gaccaccagc acctaac
47

<210> 78
<211> 197
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000153

<400> 78
tggatatcat agtcccgcat caggagcacg tgctgcctat gatcccaagc ggtggtgctt
60

tcaaggacat gatcatgggt taggtgctgg tggtccgaag gtccacgccg ccaactacgt
120

ggatatcata gtcccgcatc aggagcacgt gctgcctatg atcccaagcg gtggtgcttt
180

caaggacatg atcatgg
197

<210> 79
<211> 197
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000153

<400> 79
ccatgatcat gtccttgaaa gcaccaccgc ttgggatcat aggcagcacg tgctcctgat
60

gcgggactat gatatccacg tagttggcgg cgtggacctt cggaccacca gcacctaacc
120

catgatcatg tccttgaaag caccaccgct tgggatcata ggcagcacgt gctcctgatg
180

cgggactatg atatcca
197

<210> 80
<211> 197
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000150

<400> 80
tggatatcat agtcccgcat caggagcacg tgctgcctat gatcccaagc ggtggtgctt
60

tcaaggacat gatcatgggt taggtgctgg tggtccgaag gtccacgccg ccaactacgg
120

atggcaggac ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat
180

cagcatgatg cccgcgt
197

<210> 81
<211> 197
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000150

<400> 81
acgcgggcat catgctgatt gcgcatgtca cacttgtagg tcttgtaggt cgaaatttca
60

gtacgaggtc ctgccatccg tagttggcgg cgtggacctt cggaccacca gcacctaacc
120

catgatcatg tccttgaaag caccaccgct tgggatcata ggcagcacgt gctcctgatg
180

cgggactatg atatcca
197

<210> 82
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 82
ggagttggcg ttgatccgnc
20

<210> 83
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 83
aactacaggg ttcggaacta agtaant
27

<210> 84
<211> 102
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000267

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 84
tnantgattc ccaatggcgg cgctttcaag gacatgatca tggagggtga tggcaggacc
60

tcgtactgaa atggtccgaa ggtccacgcc gccaactacg ag
102

<210> 85
<211> 102
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000267

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 85
cnantactcg tagttggcgg cgtggacctt cggaccattt cagtacgagg tcctgccatc
60

accctccatg atcatgtcct tgaaagcgcc gccattggga at
102

<210> 86
<211> 85
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000268

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 86
tnantgattc ccaatggcgg cgctttcaag gacatgatca tggagggtga tggcaggacc
60

tcgtactgaa atttgcaggt acaag
85

<210> 87
<211> 85
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000268

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 87
angngtcttg tacctgcaaa tttcagtacg aggtcctgcc atcaccctcc atgatcatgt
60

ccttgaaagc gccgccattg ggaat
85

<210> 88
<211> 6661
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000143

<400> 88
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg
60

gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga attgaattcg agctcggtac cactggattt
120

tggttttagg aattagaaat tttattgata gaagtatttt acaaatacaa atacatacta
180

agggtttctt atatgctcaa cacatgagcg aaaccctata agaaccctaa ttcccttatc
240

tgggaactac tcacacatta ttctggagaa aaatagagag agatagattt gtagagagag
300

actggtgatt tttgcggact ctattagatc tgggtaactg gcctaactgg ccttggagga
360

gctggcaact caaaatccct ttgccaaaaa ccaacatcat gccatccacc atgcttgtat
420

ccagctgcgc gcaatgtacc ccgggctgtg tatcccaaag cctcatgcaa cctaacagat
480

ggatcgtttg gaaggcctat aacagcaacc acagacttaa aaccttgcgc ctccatagac
540

ttaagcaaat gtgtgtacaa tgtggatcct aggcccaacc tttgatgcct atgtgacacg
600

taaacagtac tctcaactgt ccaatcgtaa gcgttcctag ccttccaggg cccagcgtaa
660

gcaataccag ccacaacacc ctcaacctca gcaaccaacc aagggtatct atcttgcaac
720

ctctcgagat catcaatcca ctcttgtggt gtttgtggct ctgtcctaaa gttcactgta
780

gacgtctcaa tgtaatggtt aacgatatca caaaccgcgg ccatatcagc tgctgtagct
840

ggcctaatct caactggtct cctctccgga gacatggctt ctacctacaa aaaagctccg
900

cacgaggctg catttgtcac aaatcatgaa aagaaaaact accgatgaac aatgctgagg
960

gattcaaatt ctacccacaa aaagaagaaa gaaagatcta gcacatctaa gcctgacgaa
1020

gcagcagaaa tatataaaaa tataaaccat agtgcccttt tcccctcttc ctgatcttgt
1080

ttagcatggc ggaaatttta aacccccccat catctccccc aacaacggcg gatcgcagat
1140

ctacatccga gagccccatt ccccgcgaga tccgggccgg atccacgccg gcgagagccc
1200

cagccgcgag atcccgcccc tcccgcgcac cgatctgggc gcgcacgaag ccgcctctcg
1260

cccacccaaa ctaccaaggc caaagatcga gaccgagacg gaaaaaaaaa acggagaaag
1320

aaagaggaga ggggcggggt ggttaccggc gcggcggcgg cggaggggga ggggggagga
1380

gctcgtcgtc cggcagcgag gggggaggag gtggaggtgg tggtggtggt ggtggtaggg
1440

ttgggggat gggaggagag gggggggtat gtatatagtg gcgatggggg gcgtttcttt 1500

ggaagcggag ggagggccgg cctcgtcgct ggctcgcgat cctcctcgcg tttccggccc 1560

ccacgacccg gacccacctg ctgttttttc tttttctttt ttttctttct ttttttttt 1620

ttggctgcga gacgtgcggt gcgtgcggac aactcacggt gatagtgggg gggtgtggag 1680

actattgtcc agttggctgg actggggtgg gttgggttgg gttgggttgg gctgggcttg 1740

ctatggatcg tggatagcac tttgggcttt aggaacttta ggggttgttt ttgtaaatgt 1800

tttgagtcta agtttatctt ttatttttac tagaaaaaat acccatgcgc tgcaacgggg 1860

gaaagctatt ttaatcttat tattgttcat tgtgagaatt cgcctgaata tatatttttc 1920

tcaaaaatta tgtcaaatta gcatatgggt ttttttaaag atatttctta tacaaatccc 1980

tctgtattta caaaagcaaa cgaacttaaa acccgactca aatacagata tgcatttcca 2040

aaagcgaata aacttaaaaa ccaattcata caaaaatgac gtatcaaagt accgacaaaa 2100

acatcctcaa tttttataat agtagaaaag agtaaatttc actttgggcc acctttttatt 2160

accgatattt tactttatac cacctttaa ctgatgtttt cacttttgac caggtaatct 2220

taccttttgtt ttattttgga ctatcccgac tctcttctca agcatatgaa tgacctcgag 2280

tatgctagtc tagagtcgac ctgcagggtg cagcgtgacc cggtcgtgcc cctctctaga 2340

gataatgagc attgcatgtc taagttataa aaaattacca tatatttttt ttgtcacact 2400

tgtttgaagt gcagtttatc tatctttata catatattta aactttactc tacgaataat 2460

ataatctata gtactacaat aatatcagtg ttttagagaa tcatataaat gaacagttag 2520

acatggtcta aaggacaatt gagtattttg acaacaggac tctacagttt tatcttttta 2580

gtgtgcatgt gttctccttt ttttttgcaa atagcttcac ctatataata cttcatccat 2640

tttattagta catccattta gggtttaggg ttaatggttt ttatagacta atttttttag 2700

tacatctatt ttattctatt ttagcctcta aattaagaaa actaaaactc tattttagtt 2760

tttttattta ataatttaga tataaaatag aataaaataa agtgactaaa aattaaacaa 2820

atacccttta agaaattaaa aaaactaagg aaacattttt cttgtttcga gtagataatg 2880

ccagcctgtt aaacgccgtc gacgagtcta acggacacca accagcgaac cagcagcgtc 2940

gcgtcgggcc aagcgaagca gacggcacgg catctctgtc gctgcctctg gacccctctc 3000

gagagttccg ctccaccgtt ggacttgctc cgctgtcggc atccagaaat tgcgtggcgg 3060

agcggcagac gtgagccggc acggcaggcg gcctcctcct cctctcacgg cacggcagct 3120

acgggggatt cctttcccac cgctccttcg ctttcccttc ctcgcccgcc gtaataaata 3180

gacacccccc ccacaccctc tttccccaac ctcgtgttgt tcggagcgca cacacacaca 3240

accagatctc ccccaaatcc acccgtcggc acctccgctt caaggtacgc cgctcgtcct 3300

ccccccccccc ccctctctac cttctctaga tcggcgttcc ggtccatggt tagggcccgg 3360

tagttctact tctgttcatg tttgtgttag atccgtgttt gtgttagatc cgtgctgcta 3420

gcgttcgtac acggatgcga cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa cttgccagtg 3480

tttctctttg gggaatcctg ggatggctct agccgttccg cagacgggat cgatttcatg 3540

attttttttg tttcgttgca tagggtttgg tttgcccttt tcctttattt caatatatgc 3600

cgtgcacttg tttgtcgggt catcttttca tgctttttt tgtcttggtt gtgatgatgt 3660

ggtctggttg ggcggtcgtt ctagatcgga gtagaattct gtttcaaact acctggtgga 3720

tttattaatt ttggatctgt atgtgtgtgc catacatatt catagttacg aattgaagat 3780

gatggatgga aatatcgatc taggataggt atacatgttg atgcgggttt tactgatgca 3840

tatacagaga tgctttttgt tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtggttg ggcggtcgtt 3900

cattcgttct agatcggagt agaatactgt ttcaaactac ctggtgtatt tattaatttt 3960

ggaactgtat gtgtgtgtca tacatcttca tagttacgag tttaagatgg atggaaatat 4020

cgatctagga taggtataca tgttgatgtg ggttttactg atgcatatac atgatggcat 4080

atgcagcatc tattcatatg ctctaacctt gagtacctat ctattataat aaacaagtat 4140

gttttataat tattttgatc ttgatatact tggatgatgg catatgcagc agctatatgt 4200

ggatttttt agccctgcct tcatacgcta tttatttgct tggtactgtt tcttttgtcg 4260

atgctcaccc tgttgtttgg tgttacttct gcaggaggat cacaagtttg tacaaaaaag 4320

caggctatgg ccgccgccac ctcccccgcc gtcgcattct cgggcgccac cgccgccgcc 4380

atgcccaaac ccgcccgcca tcctctcccg cgccaccagc ccgtctcgcg ccgcgcgctc 4440

cccgcccgcg tcgtcaggtg ttgcgccgcg tcccccgccg ccacctccgc cgcgcctccc 4500

gcaaccgcgc tccggccctg gggcccgtcc gagccccgca agggcgccga catcctcgtc 4560

gaggcgctcg agcgctgcgg catcgtcgac gtcttcgcct accccggcgg cgcctccatg 4620

gagatccacc aggcgctgac gcgctcgccc gtcatcacca accacctctt ccgccacgag 4680

caggggggagg cgttcgcggc gtccggctac gcccgcgcgt ccggccgcgt cggcgtctgc 4740

gtcgccacct ccggcccggg ggccaccaac ctcgtctccg cgctcgccga cgccctcctc 4800

gactccatcc ccatggtcgc catcacgggc caggtccccc gccgcatgat cggcacggac 4860

gcgttccagg agacgcccat agtggaggtc acgcgctcca tcaccaagca caactacctg 4920

gtccttgacg tggaggatat cccccgcgtc atccaggaag ccttcttcct tgcatcctct 4980

ggccgcccgg ggccggtgct agttgatatc cccaaggaca tccagcagca gatggctgtg 5040

cccgtctggg acactccaat gagtttgcca gggtacatcg cccgcctgcc caagccacca 5100

tctactgaat cgcttgagca ggtcctgcgt ctggttggcg agtcacggcg cccaattctg 5160

tatgttggtg gtggctgcgc tgcgtctggc gaggagttgc gccgctttgt tgagcttact 5220

gggattccag ttacaactac tctgatgggc cttggcaact tccccagcga cgacccactg 5280

tctctgcgca tgcttgggat gcatggcact gtgtatgcaa attatgcagt agataaggct 5340

gacctgttgc tcgcatttgg tgtgcggttt gatgatcgtg tgactgggaa aatcgaggct 5400

tttgcaagca ggtccaagat tgtgcacatt gacattgacc cagctgagat tggcaagaac 5460

aagcagccac atgtctccat ttgtgcagat gttaagcttg ctttacaggg gttgaatgat 5520

ctattaaatg ggagcaaagc acaacagggt ctggattttg gtccatggca caaggagttg 5580

gatcagcaga agagggagtt tcctctagga ttcaagactt ttggcgaggc catcccgccg 5640

caatatgcta tccaggtact ggatgagctg acaaaagggg aggcgatcat tgccactggt 5700

gttgggcagc accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg 5760

ctgtcttcgt ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct 5820

gtggccaacc caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac 5880

attcaggagt tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac 5940

aaccagcatc tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg 6000

cacacatacc ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt 6060

gctaaaggat tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca 6120

atcaagaaga tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag 6180

gagcacgtgc tgcctatgat cccaaatggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt 6240

gatggcagga cctcgtactg atacccagct ttcttgtaca aagtggtgat cctactagta 6300

gaaggagtgc gtcgaagcag atcgttcaaa catttggcaa taaagtttct taagattgaa 6360

tcctgttgcc ggtcttgcga tgattatcat ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt 6420

aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc 6480

gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaact aggataaatt 6540

atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcgaaagctt agcttgagct tggatcagat 6600

tgtcgtttcc cgccttcagt ttaaactatc agtgtttgac aggatatatt ggcgggtaaa 6660

c
6661

<210> 89
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 89
attttccatt cacttggccc
20

<210> 90
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 90
tgctatctgg ctcagctgc
19

<210> 91
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність зонда

<400> 91
atggtggaag ggcggttgtg a
21

<210> 92
<211> 18
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 92
ctcccgcgca ccgatctg
18

<210> 93
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 93
cccgcccctc tcctctttc
19

<210> 94
<211> 21
<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність зонда

<400> 94
aagccgcctc tcgcccaccc a
21

<210> 95
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 95
aycagatgtg ggcggctcag tat
23

<210> 96
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 96
gggatatgta ggacaagaaa cttgcatga
29

<210> 97
<211> 880
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 97
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatt cccaatggcg gcgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatggtccga aggtccacgc cgccaactac gagtatgatc ccaagcggtg
600

gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac ctcgtactga aatttcgacc
660

tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg cccgcgtgtt gtatcaacta
720

ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct tgtttcattc atataagctt
780

gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg ctctcttttg tagggatgtg
840

ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
880

<210> 98
<211> 776
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 98
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct 240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct 300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt 360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat 420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct 480

gccttcccaa gcggtggtgc tttcaaggac atgatcatgg agggtgatgg caggacctcg 540

tactgaaatt tcgacctaca agacctacaa gtgtgacatg cgcaatcagc atggtgcccg 600

cgtgttgtat caactactag gggttcaact gtgaaccatg cgttttctag tttgcttgtt 660

tcattcatat aagcttgtgt tacttagttc cgaaccctgt agctttgtag tctatgctct 720

cttttgtagg gatgtgctgt cataagatat catgcaagtt tcttgtccta catatc 776

<210> 99
<211> 866
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 99
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat 60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtga
480

atggcggcgc tttcaaggac atgatcatgg agggtgatgg caggacctcg tactgaaatg
540

gtccgaaggt ccacgccgcc aactacgagt atgatcccaa gcggtggtgc ttttaaggac
600

atgatcatgg agggtgatgg caggacctcg tactgaaatt tcgacctaca agacctacaa
660

gtgtgacatg cgcaatcagc atgatacctg cgtgttgtat caactactgg gggttcaact
720

gtgaaccatg cgttttctag tttgcttgtt tcattcatat aagcttgtgt tacttagttc
780

cgaaccgtgt agttttgtag tctctgttct cttttgtagg gatgtgctgt cataagatat
840

catgcaagtt tcttgtccta catatc
866

<210> 100
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 100
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 101
<211> 867
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 101
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctaatgg cggcgctttc aaggacatga tcatggaggg tgatggcagg acctcgtact
540

gaaatggtcc gaaggtccac gccgccaact acgagtccca agcggtggtg ctttcaagga
600

catgatcatg gagggtgatg gcaggacctc gtactgaaat ttcgacctac aagacctaca
660

agtgtgacat gcgcaatcag catgatgccc gcgtgttgta tcaactacta ggggttcaac
720

tgtgagccat gcgttttcta gtttgcttgt ttcattcata taagcttgta ttacttagtt
780

ccgaaccctg tagttttgta gtctatgttc tcttttgtag ggatgtgctg tcataagatg
840

tcatgcaagt ttcttgtcct acatatc
867

<210> 102
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 102
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 103
<211> 763
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 103
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacaagcg
480

gtggtgcttt caaggacatg atcatggagg gtgatggcag gacctcgtac tgaaatttcg
540

acctacaaga cctacaagtg tgacatgcgc aatcagcatg gtgcccgcgt gttgtatcaa
600

ctactagggg ttcaactgtg aaccatgcgt tttctagttt gcttgtttca ttcatataag
660

cttgtgttac ttagttccga accctgtagc tttgtagtct atgctctctt ttgtagggat
720

gtgctgtcat aagatatcat gcaagtttct tgtcctacat atc
763

<210> 104
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 104
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat 420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct 480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac 540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg 600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct 660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg 720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc 780

<210> 105
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 105
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat 60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 106
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 106
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 107
<211> 876
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 107
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat tcccaatggc ggcgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatggtccg aaggtccacg ccgccaacta cgagtcccaa gcggtggtgc
600

tttcaaggac atgatcatgg agggtgatgg caggacctcg tactgaaatt tcgacctaca
660

agacctacaa gtgtgacatg cgcaatcagc atgatgcccg cgtgttgtat caactactag
720

gggttcaact gtgagccatg cgttttctag tttgcttgtt tcattcatat aagcttgtat
780

tacttagttc cgaaccctgt agttttgtag tctatgttct cttttgtagg gatgtgctgt
840

cataagatgt catgcaagtt tcttgtccta catatc
876

<210> 108
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 108
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 109
<211> 880
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 109
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatt cccaatggcg gcgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatggtccga aggtccacgc cgccaactac gagtatgatc ccaagcggtg
600

gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac ctcgtactga aatttcgacc
660

tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg cccgcgtgtt gtatcaacta
720

ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct tgtttcattc atataagctt
780

gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg ctctcttttg tagggatgtg
840

ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
880

<210> 110
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 110
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg
600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct
660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg
720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
780

<210> 111
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 111
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 112
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 112
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 113
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 113
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 114
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 114
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 115
<211> 880
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 115
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatt cccaatggcg gcgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatggtccga aggtccacgc cgccaactac gagtatgatc ccaagcggtg
600

gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac ctcgtactga aatttcgacc
660

tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg cccgcgtgtt gtatcaacta
720

ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct tgtttcattc atataagctt
780

gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg ctctcttttg tagggatgtg
840

ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
880

<210> 116
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 116
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg
600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct
660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg 720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc 780

<210> 117
<211> 1041
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<220>
<221> misc_feature
<222> (604)..(604)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (605)..(605)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (606)..(606)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (607)..(607)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (608)..(608)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (609)..(609)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (610)..(610)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature

<222> (611)..(611)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (612)..(612)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (613)..(613)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (614)..(614)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (615)..(615)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (616)..(616)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (617)..(617)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (618)..(618)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (619)..(619)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (620)..(620)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (621)..(621)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (622)..(622)

<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (623)..(623)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (624)..(624)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (625)..(625)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (626)..(626)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (627)..(627)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (628)..(628)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (629)..(629)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (630)..(630)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (631)..(631)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (632)..(632)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (633)..(633)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 117
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat 60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgtagttggc ggcgctttca aggacatgat catggagggt gatgkcagga cctcgtactg 540

aaatggtccg aaggtccacg cctcgtatga aatggtccga aggtccacgc cgccaactac 600

gagnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnntatgatt cccaatggcg gcttcccaat 660

ggcggcgctt tcaaggacat gatcatggag ggtgatggca ggacctcgta ctgaaatggt 720

ccgaaggtcc acgccgccaa ctacgatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat 780

catggagggt gatggcagga cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg 840

acatgcgcaa tcagcatgat acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa 900

ccatgcgttt tctagtttgc ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac 960

cgtgtagttt tgtagtctct gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc 1020

aagtttcttg tcctacatat c
1041

<210> 118
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 118
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat 60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat 600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc 660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct 720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat 780

c
781

<210> 119

<211> 881
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 119
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat tcccaatggc ggcgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatggtccg aaggtccacg ccgccaacta cgagtatgat cccaagcggt 600

ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga cctcgtactg aaatttcgac 660

ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat gcccgcgtgt tgtatcaact 720

actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc ttgtttcatt catataagct 780

tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat gttctctttt gtagggatgt 840

gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat c 881

<210> 120
<211> 918
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 120
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat tcccaatggc ggcgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaaatggtcc gaaggtccac gccgccacct cgtactgaaa tggtccraag 600

gtccacgccg ccaactacga gtatgatccc aagcggtggt gctttcaagg acatgatcat 660

ggagggtgat ggcaggacct cgtactgara tttcgaccta caagacctac aagtgtgaca 720

tgcgcaatca gcatgatgcc cgcgtgttgt atcaactact aggggttcaa ctgtgagcca 780

tgcgttttct agtttgcttg tttcattcat ataagcttgt attacttagt tccgaaccct 840

gtagttttgt agtctatgtt ctcttttgta gggatgtgct gtcataagat gtcatgcaag 900

tttcttgtcc tacatatc
918

<210> 121
<211> 880
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 121
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc 120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt 180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct 240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct 300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt 360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat 420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct 480

gcctatgatt cccaatggcg gcgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac 540

ctcgtactga aatggtccga aggtccacgc cgccaactac gagtatgatc ccaagcggtg 600

gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac ctcgtactga aatttcgacc 660

tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg cccgcgtgtt gtatcaacta 720

ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct tgtttcattc atataagctt 780

gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg ctctcttttg tagggatgtg 840

ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
880

<210> 122
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 122
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg
600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct
660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg
720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
780

<210> 123
<211> 745
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 123
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat 60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatgct tttaaggaca 480

tgatcatgga gggtgatggc aggacctcgt actgaaattt cgacctacaa gacctacaag 540

tgtgacatgc gcaatcagca tgatacctgc gtgttgtatc aactactggg ggttcaactg 600

tgaaccatgc gttttctagt ttgcttgttt cattcatata agcttgtgtt acttagttcc 660

gaaccgtgta gttttgtagt ctctgttctc ttttgtaggg atgtgctgtc ataagatatc 720

atgcaagttt cttgtcctac atatc
745

<210> 124
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 124
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat 60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat 600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc 660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct 720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat 780

c
781

<210> 125
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 125
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat 600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc 660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat 720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat 780

c
781

<210> 126
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 126
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat 600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc 660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat 720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat 780

c
781

<210> 127
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 127
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg
600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct
660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg
720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
780

<210> 128
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 128
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg
600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct
660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg
720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
780

<210> 129
<211> 881
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 129
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat tcccaatggc ggcgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatggtccg aaggtccacg ccgccaacta cgagtatgat cccaagcggt
600

ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga cctcgtactg aaatttcgac
660

ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat acctgcgtgt tgtatcaact
720

actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc ttgtttcatt catataagct
780

tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct gttctctttt gtagggatgt
840

gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat c
881

<210> 130
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 130
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 131
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 131
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatcgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatggt
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 132
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 132
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatcgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatggt
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 133
<211> 880
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 133
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct 300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt 360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat 420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct 480

gcctatgatt cccaatggcg gcgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac 540

ctcgtactga aatggtccga aggtccacgc cgccaactac gagtatgatc ccaagcggtg 600

gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac ctcgtactga aatttcgacc 660

tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg cccgcgtgtt gtatcaacta 720

ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct tgtttcattc atataagctt 780

gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg ctctcttttg tagggatgtg 840

ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc 880

<210> 134
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 134
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc 120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt 180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct 240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct 300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt 360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat 420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct 480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac 540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg 600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct 660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg 720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc 780

<210> 135
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 135
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat 60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat 600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc 660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct 720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat 780

c
781

<210> 136
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 136
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat 60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat 600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc 660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct 720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat 780

c
781

<210> 137
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 137
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 138
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 138
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 139
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 139
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct 480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac 540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg 600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct 660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg 720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc 780

<210> 140
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 140
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc 120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt 180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct 240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct 300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt 360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat 420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct 480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg
600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct
660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg
720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
780

<210> 141
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 141
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 142
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 142
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 143
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 143
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 144
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 144
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 145
<211> 880
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 145
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatt cccaatggcg gcgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatggtccga aggtccacgc cgccaactac gagtatgatc ccaagcggtg
600

gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac ctcgtactga aatttcgacc
660

tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg cccgcgtgtt gtatcaacta
720

ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct tgtttcattc atataagctt
780

gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg ctctcttttg tagggatgtg
840

ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
880

<210> 146
<211> 880
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 146
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatt cccaatggcg gcgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatggtccga aggtccacgc cgccaactac gagtatgatc ccaagcggtg
600

gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac ctcgtactga aatttcgacc
660

tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg cccgcgtgtt gtatcaacta
720

ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct tgtttcattc atataagctt
780

gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg ctctcttttg tagggatgtg
840

ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
880

<210> 147
<211> 865
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 147
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctgcgct ttcaaggaca tgatcatgga gggtgatggc aggacctcgt actgaaatgg
540

tccgaaggtc cacgccgcca actacgagta tgatcccaag cggtggtgct tttaaggaca
600

tgatcatgga gggtgatggc aggacctcgt actgaaattt cgacctacaa gacctacaag
660

tgtgacatgc gcaatcagca tgatacctgc gtgttgtatc aactactggg ggttcaactg
720

tgaaccatgc gttttctagt ttgcttgttt cattcatata agcttgtgtt acttagttcc
780

gaaccgtgta gttttgtagt ctctgttctc ttttgtaggg atgtgctgtc ataagatatc
840

atgcaagttt cttgtcctac atatc
865

<210> 148
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 148
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 149
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 149
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat 720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat 780

c
781

<210> 150
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 150
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat 600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc 660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat 720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 151
<211> 880
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 151
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatt cccaatggcg gcgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatggtccga aggtccacgc cgccaactac gagtatgatc ccaagcggtg
600

gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac ctcgtactga aatttcgacc
660

tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg cccgcgtgtt gtatcaacta
720

ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct tgtttcattc atataagctt
780

gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg ctctcttttg tagggatgtg
840

ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
880

<210> 152
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 152
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg
600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct
660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg
720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
780

<210> 153
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 153
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat 60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat 600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc 660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct 720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat 780

c
781

<210> 154

<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 154
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat 60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat 600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc 660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct 720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat 780

c
781

<210> 155
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 155
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat 600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc 660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat 720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat 780

c
781

<210> 156
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 156
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat 600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc 660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat 720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat 780

c
781

<210> 157
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 157
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg
600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct
660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg
720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
780

<210> 158
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 158
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt 180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct 240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct 300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt 360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat 420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct 480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac 540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg 600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct 660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg 720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc 780

<210> 159
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 159
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat 60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 160
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 160
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 161
<211> 881
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 161
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat tcccaatggc ggcgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatggtccg aaggtccacg ccgccaacta cgagtatgat cccaagcggt
600

ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga cctcgtactg aaatttcgac
660

ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat gcccgcgtgt tgtatcaact
720

actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc ttgtttcatt catataagct
780

tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat gttctctttt gtagggatgt
840

gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat c
881

<210> 162
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 162
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 163
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 163
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct 480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac 540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg 600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct 660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg 720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc 780

<210> 164
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 164
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc 120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt 180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct 240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct 300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt 360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat 420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct 480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac 540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg
600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct
660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg
720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
780

<210> 165
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 165
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 166
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 166
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 167
<211> 771
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 167
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgt
480

cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga cctcgtactg
540

aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat gcccgcgtgt
600

tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc ttgtttcatt
660

catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat gttctctttt
720

gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat c
771

<210> 168
<211> 854
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 168
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat tcccaatggc ggcgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatggtccg aaggtcaagc ggtggtgctt tcaaggacat gatcatggag 600

ggtgatggca ggacctcgta ctgaaatttc gacctacaag acctacaagt gtgacatgcg 660

caatcagcat gatgcccgcg tgttgtatca actactaggg gttcaactgt gagccatgcg 720

ttttctagtt tgcttgtttc attcatataa gcttgtatta cttagttccg aaccctgtag 780

ttttgtagtc tatgttctct tttgtaggga tgtgctgtca taagatgtca tgcaagtttc 840

ttgtcctaca tatc
854

<210> 169
<211> 843
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 169
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc 120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt 180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct 240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct 300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt 360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat 420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct 480

gcctatgatt cccaatggcg gcgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac 540

ctcgtactga aatttgcagg gtggtgcttt caaggacatg atcatggagg gtgatggcag 600

gacctcgtac tgaaatttcg acctacaaga cctacaagtg tgacatgcgc aatcagcatg 660

gtgcccgcgt gttgtatcaa ctactagggg ttcaactgtg aaccatgcgt tttctagttt 720

gcttgtttca ttcatataag cttgtgttac ttagttccga accctgtagc tttgtagtct 780

atgctctctt ttgtagggat gtgctgtcat aagatatcat gcaagtttct tgtcctacat 840

atc
843

<210> 170
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 170
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt 60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc 120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt 180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct 240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct 300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt 360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat 420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct 480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac 540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg 600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct 660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg 720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc 780

<210> 171
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 171
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat 60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat 600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc 660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct 720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat 780

c
781

<210> 172
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 172
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat 60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc 120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt 180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc 240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc 300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat 360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga 420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc 480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga 540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat 600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc 660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct 720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat 780

c
781

<210> 173
<211> 854
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 173
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat tcccaatggc ggcgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatggtccg aaggtcaagc ggtggtgctt tcaaggacat gatcatggag
600

ggtgatggca ggacctcgta ctgaaatttc gacctacaag acctacaagt gtgacatgcg
660

caatcagcat gatgcccgcg tgttgtatca actactaggg gttcaactgt gagccatgcg
720

ttttctagtt tgcttgtttc attcatataa gcttgtatta cttagttccg aaccctgtag
780

ttttgtagtc tatgttctct tttgtaggga tgtgctgtca taagatgtca tgcaagtttc
840

ttgtcctaca tatc
854

<210> 174
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 174
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 175
<211> 859
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 175
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatt cccaatggcg gcgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatttgcagg tacaagatcc caagcggtgg tgctttcaag gacatgatca
600

tggagggtga tggcaggacc tcgtactgaa atttcgacct acaagaccta caagtgtgac
660

atgcgcaatc agcatggtgc ccgcgtgttg tatcaactac taggggttca actgtgaacc
720

atgcgttttc tagtttgctt gtttcattca tataagcttg tgttacttag ttccgaaccc
780

tgtagctttg tagtctatgc tctcttttgt agggatgtgc tgtcataaga tatcatgcaa
840

gtttcttgtc ctacatatc
859

<210> 176
<211> 780
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 176
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggttgggg gcaatgggat ttgggttacc agctgcagct ggcgctgctg tggccaaccc
120

aggtgttaca gttgttgaca ttgatggaga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt
180

ggcattgatc cgtattgaga acctccctgt gaaggtgatg atattgaaca accagcatct
240

gggaatggtg gtgcaatggg aggataggtt ttacaaggcc aatcgggcgc acacatacct
300

tggcaaccca gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt
360

caacgttccg gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat
420

gcttgagacc ccagggccat acttgttgga tatcatcgtc ccgcatcagg agcacgtgct
480

gcctatgatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
540

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg
600

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct
660

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg
720

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcataag atatcatgca agtttcttgt cctacatatc
780

<210> 177
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 177
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 178
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 178
atcagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcat
60

ccggtttggg tgcaatggga tttgggttgc cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatgggg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgtattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caaccgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc ggcagttcgt gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcattgt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttta aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

acctgcgtgt tgtatcaact actgggggtt caactgtgaa ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtgttactt agttccgaac cgtgtagttt tgtagtctct
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatatcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 179
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 179
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 180
<211> 781
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Інсерція донора відбувається в результаті ампліфікації ділянки гена AHAS пшениці

<400> 180
accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg ctgtcttcgt
60

ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct gtggccaacc
120

caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac attcaggagt
180

tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac aaccagcatc
240

tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg cacacatacc
300

ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt gctaaaggat
360

tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca atcaagaaga
420

tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag gagcacgtgc
480

tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt gatggcagga
540

cctcgtactg aaatttcgac ctacaagacc tacaagtgtg acatgcgcaa tcagcatgat
600

gcccgcgtgt tgtatcaact actaggggtt caactgtgag ccatgcgttt tctagtttgc
660

ttgtttcatt catataagct tgtattactt agttccgaac cctgtagttt tgtagtctat
720

gttctctttt gtagggatgt gctgtcataa gatgtcatgc aagtttcttg tcctacatat
780

c
781

<210> 181
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 181

Gln Ser Ser His Leu Thr Arg
1 5

<210> 182
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 182

Arg Ser Asp Asp Leu Thr Arg
1 5

<210> 183
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 183

Tyr Arg Trp Leu Leu Arg Ser
1 5

<210> 184
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 184

Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg
1 5

<210> 185
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 185

Gln Arg Asn Ala Arg Thr Leu
1 5

<210> 186
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 186

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Val
1 5

<210> 187
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 187

Gln Lys Ile Asn Leu Gln Val
1 5

<210> 188
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 188

Asp Asp Trp Asn Leu Ser Gln
1 5

<210> 189
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 189

Arg Ser Ala Asn Leu Thr Arg
1 5

<210> 190
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 190

Gln Ser Gly His Leu Ala Arg
1 5

<210> 191
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 191

Asn Asp Trp Asp Arg Arg Val
1 5

<210> 192
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 192

Arg Ser Asp His Leu Ser Gln
1 5

<210> 193
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 193

Asp Ser Ser Thr Arg Lys Lys
1 5

<210> 194
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 194

Arg Ser Asp Val Leu Ser Glu
1 5

<210> 195
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 195

Asp Arg Ser Asn Arg Ile Lys
1 5

<210> 196
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 196

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Asn
1 5

<210> 197
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 197

Thr Ser Ser Ser Arg Ile Asn
1 5

<210> 198
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 198

Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg
1 5

<210> 199
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 199

Gln Ser Ser Asp Leu Ser Arg
1 5

<210> 200
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 200

Gln Ser Ala His Arg Lys Asn
1 5

<210> 201
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 201

Asp Arg Ser His Leu Thr Arg
1 5

<210> 202
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 202

Gln Ser Gly His Leu Ser Arg
1 5

<210> 203
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 203

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu
1 5

<210> 204
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 204

His Ser Asn Ala Arg Lys Thr
1 5

<210> 205
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 205

Thr Ser Gly Asn Leu Thr Arg
1 5

<210> 206
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 206

His Arg Thr Ser Leu Thr Asp
1 5

<210> 207
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 207

His Lys Tyr His Leu Arg Ser
1 5

<210> 208
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 208

Gln Trp Ser Thr Arg Lys Arg
1 5

<210> 209
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 209

Ser Pro Ser Ser Arg Arg Thr
1 5

<210> 210
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 210

Thr Ala Arg Gln Arg Asn Arg
1 5

<210> 211
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 211

Asp Arg Ser His Leu Ala Arg
1 5

<210> 212
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 212

Arg Ser Asp Ser Leu Ser Ala
1 5

<210> 213
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 213

Arg Ser Asp Ala Leu Ala Arg
1 5

<210> 214
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 214

Gln Lys Ser Asn Leu Ser Ser
1 5

<210> 215
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 215

Asp Ser Ser Asp Arg Lys Lys
1 5

<210> 216
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 216

Trp Trp Thr Ser Arg Ala Leu
1 5

<210> 217
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 217

Asp Arg Ser Asp Leu Ser Arg
1 5

<210> 218
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 218

Arg Ser Asp His Leu Ser Glu
1 5

<210> 219
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 219

Tyr Ser Trp Arg Leu Ser Gln
1 5

<210> 220
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 220

Arg Ser Asp Ser Leu Ser Val
1 5

<210> 221
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 221

Arg Asn Gln Asp Arg Lys Asn
1 5

<210> 222
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 222

Gln Ser Gly Asn Leu Ala Arg
1 5

<210> 223
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 223

Asp Arg Ser Ala Leu Ala Arg
1 5

<210> 224
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 224

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Thr
1 5

<210> 225
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 225

Ala Gln Trp Gly Arg Thr Ser
1 5

<210> 226
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 226

Arg Ser Ala Asp Leu Thr Arg
1 5

<210> 227
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 227

Thr Asn Gln Asn Arg Ile Thr
1 5

<210> 228
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 228

Arg Ser Asp Ser Leu Leu Arg
1 5

<210> 229
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 229

Leu Gln His His Leu Thr Asp
1 5

<210> 230
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 230

Gln Asn Ala Thr Arg Ile Asn
1 5

<210> 231
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 231

Met Arg Asn Arg Leu Asn Arg
1 5

<210> 232
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 232

Asp Arg Ser Asn Leu Ser Arg
1 5

<210> 233
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 233

Trp Arg Ser Cys Arg Ser Ala
1 5

<210> 234
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 234

Gln Trp Phe Gly Arg Lys Asn
1 5

<210> 235
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 235

Gln Trp Phe Gly Arg Lys Asn
1 5

<210> 236
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 236

Arg Ser Asp Ala Leu Thr Gln
1 5

<210> 237
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 237

Glu Arg Gly Thr Leu Ala Arg
1 5

<210> 238
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 238

Asp Thr Gly Ala Arg Leu Lys
1 5

<210> 239
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 239

His Arg Arg Ser Arg Asp Gln
1 5

<210> 240
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 240

Asp Arg Ser Tyr Arg Asn Thr
1 5

<210> 241
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 241

Arg Ser Ala Asp Leu Ser Arg
1 5

<210> 242
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 242

Arg Ser Asp His Leu Ser Ala
1 5

<210> 243
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 243

Gln Ser Ser Asp Leu Arg Arg
1 5

<210> 244
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 244

Arg Ser Asp Asp Arg Lys Thr
1 5

<210> 245
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 245

Arg Arg Ala Asp Arg Ala Lys
1 5

<210> 246
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 246

Thr Ser Ser Asp Arg Lys Lys
1 5

<210> 247
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 247

Arg Asn Asp Asp Arg Lys Lys
1 5

<210> 248
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 248

Asp Ser Ser Thr Arg Arg Arg
1 5

<210> 249
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 249

His Ser Arg Thr Arg Thr Lys
1 5

<210> 250
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 250

Asn Asn Arg Asp Arg Thr Lys
1 5

<210> 251
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 251

Val Ser Ser Asn Leu Thr Ser
1 5

<210> 252
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 252

Arg Ser Asp Ala Leu Ser Val
1 5

<210> 253
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 253

Asp Ser Ser His Arg Thr Arg
1 5

<210> 254
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 254

Arg Ser Asp Asn Leu Thr Arg
1 5

<210> 255
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 255

Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg
1 5

<210> 256
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 256

Asp Arg Ser His Leu Ser Arg
1 5

<210> 257
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 257

Thr Ser Ser Asn Arg Lys Thr
1 5

<210> 258
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 258

Arg Ser Asp Asp Leu Ser Lys
1 5

<210> 259
<211> 7

<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 259

Arg Ser Ala His Leu Ser Arg
1 5

<210> 260
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 260

Arg Ser Asp Ala Leu Ser Thr
1 5

<210> 261
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 261

Asp Arg Ser Thr Arg Thr Lys
1 5

<210> 262
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зв'язувальний мотив ZFN

<400> 262

Thr Ser Ser Asp Arg Thr Lys
1 5

<210> 263
<211> 28

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 263
cngcggccat ggcggcggcg agggtttg
28

<210> 264
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 264
acctcccccg ccgtcgcatt ctcnggcg
28

<210> 265
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 265
ggccggacgc gcgggcgtan ccggacgc
28

<210> 266

<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 266
cgtcggcgtc tgcgtcgcca cctccggc
28

<210> 267
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 267
acgccgacgc ggccggacgc gcgggcgt
28

<210> 268
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 268
gcgtcgccac ctccggcccg ggggccac
28

<210> 269
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 269
cagacgccga cgcggccgga cgcgcggg
28

<210> 270
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 270
gtcgccacct ccggcccggg ggccacca
28

<210> 271
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 271
gcgacgcaga cgccgacgcg gccggacg
28

<210> 272
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 272
cctccggccc gggggccacc aacctcgt
28

<210> 273
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 273
gggatggagt cgaggagngc gtcngcga
28

<210> 274
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 274
tggtcgccat cacgggccag gtcccccg
28

<210> 275
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ssss

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 275
accatgggga tggagtcgag gagngcgt
28

<210> 276
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 276
ccatcacggg ccaggtcccc cgccgcat
28

<210> 277
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 277
cgaccatggg gatggagtcg aggagngc
28

<210> 278
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Сайт-мішень для ZFN

<400> 278
catcacgggc caggtccccc gccgcatg
28

<210> 279
<211> 55
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(54)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 279
ancactcttt ccctacacga cgctcttccg atcttcccca attccaaccc tctnc
55

<210> 280
<211> 56
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(55)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 280
gntgactgga gttcagacgt gtgctcttcc gatctcgtca gcgcctggtg gatcnt
56

<210> 281
<211> 54
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (53)..(53)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 281
ancactcttt ccctacacga cgctcttccg atctgcccgt ccgagccccg cana
54

<210> 282
<211> 56
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(55)

<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 282
gntgactgga gttcagacgt gtgctcttcc gatctcgtca gcgcctggtg gatcnt
56

<210> 283
<211> 53
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(52)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 283
ancactcttt ccctacacga cgctcttccg atctgcgctc gcccgtcatc anc
53

<210> 284
<211> 56
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(55)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 284
gntgactgga gttcagacgt gtgctcttcc gatctatggg gatggagtcg aggang
56

<210> 285

<211> 53
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(52)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 285
ancactcttt ccctacacga cgctcttccg atctcttccg ccacgagcag gng
53

<210> 286
<211> 56
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(55)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 286
gntgactgga gttcagacgt gtgctcttcc gatctatggg gatggagtcg aggang
56

<210> 287
<211> 54
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (53)..(53)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 287
ancactcttt ccctacacga cgctcttccg atcttcgtct ccgcgctcgc tgna
54

<210> 288
<211> 56
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n являє собою a, c, g або t

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(55)
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 288
gntgactgga gttcagacgt gtgctcttcc gatcttccac tatgggcgtc tcctng
56

<210> 289
<211> 6661
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000164

<400> 289
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg
60

gacgttttta atgtactgaa ttaacgccga attgaattcg agctcggtac cactggattt
120

tggttttagg aattagaaat tttattgata gaagtatttt acaaatacaa atacatacta
180

agggtttctt atatgctcaa cacatgagcg aaaccctata agaaccctaa ttcccttatc
240

tgggaactac tcacacatta ttctggagaa aaatagagag agatagattt gtagagagag
300

actggtgatt tttgcggact ctattagatc tgggtaactg gcctaactgg ccttggagga
360

gctggcaact caaaatccct ttgccaaaaa ccaacatcat gccatccacc atgcttgtat
420

ccagctgcgc gcaatgtacc ccgggctgtg tatcccaaag cctcatgcaa cctaacagat
480

ggatcgtttg gaaggcctat aacagcaacc acagacttaa aaccttgcgc ctccatagac
540

ttaagcaaat gtgtgtacaa tgtggatcct aggcccaacc tttgatgcct atgtgacacg
600

taaacagtac tctcaactgt ccaatcgtaa gcgttcctag ccttccaggg cccagcgtaa
660

gcaataccag ccacaacacc ctcaacctca gcaaccaacc aagggtatct atcttgcaac
720

ctctcgagat catcaatcca ctcttgtggt gtttgtggct ctgtcctaaa gttcactgta
780

gacgtctcaa tgtaatggtt aacgatatca caaaccgcgg ccatatcagc tgctgtagct
840

ggcctaatct caactggtct cctctccgga gacatggctt ctacctacaa aaaagctccg
900

cacgaggctg catttgtcac aaatcatgaa aagaaaaact accgatgaac aatgctgagg
960

gattcaaatt ctacccacaa aaagaagaaa gaaagatcta gcacatctaa gcctgacgaa
1020

gcagcagaaa tatataaaaa tataaaccat agtgcccttt tcccctcttc ctgatcttgt
1080

ttagcatggc ggaaatttta aacccccccat catctccccc aacaacggcg gatcgcagat
1140

ctacatccga gagccccatt ccccgcgaga tccgggccgg atccacgccg gcgagagccc
1200

cagccgcgag atcccgcccc tcccgcgcac cgatctgggc gcgcacgaag ccgcctctcg
1260

cccacccaaa ctaccaaggc caaagatcga gaccgagacg gaaaaaaaaa acggagaaag 1320

aaagaggaga ggggcggggt ggttaccggc gcggcggcgg cggaggggga ggggggagga 1380

gctcgtcgtc cggcagcgag gggggaggag gtggaggtgg tggtggtggt ggtggtaggg 1440

ttgggggggat gggaggagag gggggggtat gtatatagtg gcgatggggg gcgtttcttt 1500

ggaagcggag ggagggccgg cctcgtcgct ggctcgcgat cctcctcgcg tttccggccc 1560

ccacgacccg gacccacctg ctgtttttttc ttttttcttt ttttctttct ttttttttttt 1620

ttggctgcga gacgtgcggt gcgtgcggac aactcacggt gatagtgggg gggtgtggag 1680

actattgtcc agttggctgg actggggtgg gttgggttgg gttgggttgg gctgggcttg 1740

ctatggatcg tggatagcac tttgggcttt aggaacttta ggggttgttt ttgtaaatgt 1800

tttgagtcta agtttatctt ttatttttac tagaaaaaat acccatgcgc tgcaacgggg 1860

gaaagctatt ttaatcttat tattgttcat tgtgagaatt cgcctgaata tatatttttc 1920

tcaaaaatta tgtcaaatta gcatatgggt ttttttaaag atatttctta tacaaatccc 1980

tctgtattta caaaagcaaa cgaacttaaa acccgactca aatacagata tgcatttcca 2040

aaagcgaata aacttaaaaa ccaattcata caaaaatgac gtatcaaagt accgacaaaa 2100

acatcctcaa tttttataat agtagaaaag agtaaatttc actttgggcc acctttttatt 2160

accgatattt tactttatac cacctttaa ctgatgtttt cacttttgac caggtaatct 2220

taccttttgtt ttattttgga ctatcccgac tctcttctca agcatatgaa tgacctcgag 2280

tatgctagtc tagagtcgac ctgcagggtg cagcgtgacc cggtcgtgcc cctctctaga 2340

gataatgagc attgcatgtc taagttataa aaaattacca catatttttt ttgtcacact 2400

tgtttgaagt gcagtttatc tatctttata catatattta aactttactc tacgaataat 2460

ataatctata gtactacaat aatatcagtg ttttagagaa tcatataaat gaacagttag 2520

acatggtcta aaggacaatt gagtattttg acaacaggac tctacagttt tatcttttta 2580

gtgtgcatgt gttctccttt ttttttgcaa atagcttcac ctatataata cttcatccat 2640

tttattagta catccattta gggtttaggg ttaatggttt ttatagacta atttttttag 2700

tacatctatt ttattctatt ttagcctcta aattaagaaa actaaaactc tattttagtt 2760

tttttattta ataatttaga tataaaatag aataaaataa agtgactaaa aattaaacaa 2820

atacccttta agaaattaaa aaaactaagg aaacattttt cttgtttcga gtagataatg 2880

ccagcctgtt aaacgccgtc gacgagtcta acggacacca accagcgaac cagcagcgtc 2940

gcgtcgggcc aagcgaagca gacggcacgg catctctgtc gctgcctctg gacccctctc 3000

gagagttccg ctccaccgtt ggacttgctc cgctgtcggc atccagaaat tgcgtggcgg 3060

agcggcagac gtgagccggc acggcaggcg gcctcctcct cctctcacgg cacggcagct 3120

acgggggatt cctttcccac cgctccttcg ctttcccttc ctcgcccgcc gtaataaata 3180

gacacccccc ccacaccctc tttccccaac ctcgtgttgt tcggagcgca cacacacaca 3240

accagatctc ccccaaatcc acccgtcggc acctccgctt caaggtacgc cgctcgtcct 3300

ccccccccccc ccctctctac cttctctaga tcggcgttcc ggtccatggt tagggcccgg 3360

tagttctact tctgttcatg tttgtgttag atccgtgttt gtgttagatc cgtgctgcta 3420

gcgttcgtac acggatgcga cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa cttgccagtg 3480

tttctctttg gggaatcctg ggatggctct agccgttccg cagacgggat cgatttcatg 3540

attttttttg tttcgttgca tagggtttgg tttgcccttt tcctttattt caatatatgc 3600

cgtgcacttg tttgtcgggt catcttttca tgctttttt tgtcttggtt gtgatgatgt 3660

ggtctggttg ggcggtcgtt ctagatcgga gtagaattct gtttcaaact acctggtgga 3720

tttattaatt ttggatctgt atgtgtgtgc catacatatt catagttacg aattgaagat 3780

gatggatgga aatatcgatc taggataggt atacatgttg atgcgggttt tactgatgca 3840

tatacagaga tgctttttgt tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtggttg ggcggtcgtt 3900

cattcgttct agatcggagt agaatactgt ttcaaactac ctggtgtatt tattaatttt 3960

ggaactgtat gtgtgtgtca tacatcttca tagttacgag tttaagatgg atggaaatat 4020

cgatctagga taggtataca tgttgatgtg ggttttactg atgcatatac atgatggcat 4080

atgcagcatc tattcatatg ctctaacctt gagtacctat ctattataat aaacaagtat 4140

gttttataat tattttgatc ttgatatact tggatgatgg catatgcagc agctatatgt 4200

ggatttttt agccctgcct tcatacgcta tttatttgct tggtactgtt tcttttgtcg 4260

atgctcaccc tgttgtttgg tgttacttct gcaggaggat cacaagtttg tacaaaaaag 4320

caggctatgg ccgccgccac ctcccccgcc gtcgcattct cgggcgccac cgccgccgcc 4380

atgcccaaac ccgcccgcca tcctctcccg cgccaccagc ccgtctcgcg ccgcgcgctc 4440

cccgcccgcg tcgtcaggtg ttgcgccgcg tcccccgccg ccacctccgc cgcgcctccc 4500

gcaaccgcgc tccggccctg gggcccgtcc gagccccgca agggcgccga catcctcgtc 4560

gaggcgctcg agcgctgcgg catcgtcgac gtcttcgcct accccggcgg cgcctccatg 4620

gagatccacc aggcgctgac gcgctcgccc gtcatcacca accacctctt ccgccacgag 4680

cagggggagg cgttcgcggc gtccggctac gcccgcgcgt ccggccgcgt cggcgtctgc 4740

gtcgccacct ccggcccggg ggccaccaac ctcgtctccg cgctcgccga cgccctcctc 4800

gactccatcc ccatggtcgc catcacgggc caggtctccc gccgcatgat cggcacggac 4860

gcgttccagg agacgcccat agtggaggtc acgcgctcca tcaccaagca caactacctg 4920

gtccttgacg tggaggatat cccccgcgtc atccaggaag ccttcttcct tgcatcctct 4980

ggccgcccgg ggccggtgct agttgatatc cccaaggaca tccagcagca gatggctgtg 5040

cccgtctggg acactccaat gagtttgcca gggtacatcg cccgcctgcc caagccacca 5100

tctactgaat cgcttgagca ggtcctgcgt ctggttggcg agtcacggcg cccaattctg 5160

tatgttggtg gtggctgcgc tgcgtctggc gaggagttgc gccgctttgt tgagcttact 5220

gggattccag ttacaactac tctgatgggc cttggcaact tccccagcga cgacccactg 5280

tctctgcgca tgcttgggat gcatggcact gtgtatgcaa attatgcagt agataaggct 5340

gacctgttgc tcgcatttgg tgtgcggttt gatgatcgtg tgactgggaa aatcgaggct 5400

tttgcaagca ggtccaagat tgtgcacatt gacattgacc cagctgagat tggcaagaac 5460

aagcagccac atgtctccat ttgtgcagat gttaagcttg ctttacaggg gttgaatgat 5520

ctattaaatg ggagcaaagc acaacagggt ctggattttg gtccatggca caaggagttg 5580

gatcagcaga agagggagtt tcctctagga ttcaagactt ttggcgaggc catcccgccg 5640

caatatgcta tccaggtact ggatgagctg acaaaagggg aggcgatcat tgccactggt 5700

gttgggcagc accagatgtg ggcggctcag tattacactt acaagcggcc acggcagtgg 5760

ctgtcttcgt ctggtttggg ggcaatggga tttgggttac cagctgcagc tggcgctgct 5820

gtggccaacc caggtgttac agttgttgac attgatggtg atggtagttt cctcatgaac 5880

attcaggagt tggcgttgat ccgcattgag aacctcccag tgaaggtgat gatattgaac 5940

aaccagcatc tgggaatggt ggtgcagtgg gaggataggt tttacaaggc caatcgggcg 6000

cacacatacc ttggcaaccc agaaaatgag agtgagatat atccagattt tgtgacgatt 6060

gctaaaggat tcaacgttcc agcagttcga gtgacgaaga agagcgaagt cactgcagca 6120

atcaagaaga tgcttgagac cccagggcca tacttgttgg atatcatagt cccgcatcag 6180

gagcacgtgc tgcctatgat cccaagcggt ggtgctttca aggacatgat catggagggt 6240

gatggcagga cctcgtactg atacccagct ttcttgtaca aagtggtgat cctactagta 6300

gaaggagtgc gtcgaagcag atcgttcaaa catttggcaa taaagtttct taagattgaa 6360

tcctgttgcc ggtcttgcga tgattatcat ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt 6420

aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc 6480

gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaact aggataaatt 6540

atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcgaaagctt agcttgagct tggatcagat 6600

tgtcgtttcc cgccttcagt ttaaactatc agtgtttgac aggatatatt ggcgggtaaa 6660

c
6661

<210> 290
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 290
gcgaagatcc aggacaagga
20

<210> 291
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 291
ctgcttaccg gcaaagatga g
21

<210> 292
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 292
ttcccccgga ccagcagcgt
20

<210> 293
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 293
ccgacgagaa agaccagcaa
20

<210> 294
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність праймера

<400> 294
cttaagttgt cgatcgggac tgt
23

<210> 295
<211> 2571
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000435

<400> 295
tgagattggc aagaacaagc agccacatgt ctccatttgt gcagatgtta agcttgcttt
60

acaggggttg aatgatctat taaatgggag caaagcacaa cagggtctgg attttggtcc
120

atggcacaag gagttggatc agcagaagag ggagtttcct ctaggattca agacttttgg
180

cgaggccatc ccgccgcaat atgctatcca ggtactggat gagctgacaa aaggggaggc
240

gatcattgcc actggtgttg ggcagcacca gatgtgggcg gctcagtatt acacttacaa
300

gcggccacgg cagtggctgt cttcgtctgg tttgggggca atgggatttg ggttaccagc
360

tgcagctggc gctgctgtgg ccaacccagg tgttacagtt gttgacattg atggtgatgg
420

tagtttcctc atgaacattc aggagttggc gttgatccgc attgagaacc tcccagtgaa
480

ggtgatgata ttgaacaacc agcatctggg aatggtggtg cagtgggagg ataggtttta
540

caaggccaat cgggcgcaca cataccttgg caacccagaa aatgagagtg agatatatcc
600

agattttgtg acgattgcta aaggattcaa cgttccagca gttcgagtga cgaagaagag
660

cgaagtcact gcagcaatca agaagatgct tgagacccca gggccatact tgttggatat
720

catagtcccg catcaggagc acgtgctgcc tatgattcca aacggcggcg ccttcaagga
780

catgatcatg gagggtgatg gcaggacctc gtactgaaat ttcgacctac aagacctaca
840

agtgtgacat gcgcaatcag catggtgccc gcgtgttgta tcaactacta ggggttcaac
900

tgtgaaccat gcgttttcta gtttgcttgt ttcattcata taagcttgtg ttacttagtt
960

ccgaaccctg tagctttgta gtctatgctc tcttttgtag ggatgtgctg tcataagata
1020

tcatgcaagt ttcttgtcct acatatcaat aataagtact tccatggaat aattctcagt
1080

tctgttttga attttgcatc ttctcacaaa cagtgtgctg gttcctttct gttcgctgac
1140

gccctcctcg actccatccc catggtcgcc atcacgggcc aggtcccccg ccgcatgatc
1200

ggtagcgact tcgtgggcga ggaaagcctt tcgtccaagg tggtccctcc tcgcaatctt
1260

gttggatggt gaatattata aaagcctgcc cttctcgcgg gtaagactcc cgcccatcca
1320

ggatgaggat gaccagcctt ttgcagttta tccactaggg acaggattgc atcctgccga
1380

aaccctgcca agcttgaggt agcctccaat ttgacggtgc cgccagcgac gccgtctgga
1440

actgtccttt ttgaggacca ctccgtttgt ctagaggtac ctggagatca tgacattaag
1500

gatgaccagt tcgtaaaggt cctgcggtgt ctattgcttt tcataggtta ataagtgttt
1560

gctagactgt ggtgaaaggc caagactccc gcccatctct ctatgcccgg gacaagtgcc
1620

accccacagt ggggcaggat gaggatgacc aaagactccc gcccatctca ctagggacag
1680

gattggcctt ttgcagttta tctctatgcc cgggacaagt gtatccgaag taaataaaac
1740

catcggactc tcgtataaga ctgtcgactc gaccggccga cgcataggtt catttgaagc
1800

tgctattcta tttaaattga aatcccaagc ggtggtgctt tcaaggacat gatcatggag
1860

ggtgatggca ggacctcgta ctgaaatttc gacctacaag acctacaagt gtgacatgcg
1920

caatcagcat gatgcccgcg tgttgtatca actactaggg gttcaactgt gagccatgcg
1980

ttttctagtt tgcttgtttc attcatataa gcttgtatta cttagttccg aaccctgtag
2040

ttttgtagtc tatgttctct tttgtaggga tgtgctgtca taagatgtca tgcaagtttc
2100

ttgtcctaca tatcaataat aagtacttcc atggaataat tctcagttct gttttgaatt
2160

ttgcatcttc tcacaaacag tgtgctggtt cctttctgtt actttacatg tctgctgtgt
2220

caggttctga cataacgacc gatggagggt ggtcggcagg ttttagaagg ggaattgaaa
2280

ctttttttg ggaagaagtc tgaatacagt tgggaggaaa aatagaagta tatacttcga
2340

ttaatttatc aagcccgcta tccagtctaa tttatcaagc actagacagt gtagggtgtt
2400

ggcattcttc tcttccttga gatccggctt gagaggagag accgaggctt cggctgtgtt
2460

ggttgctgat ttctacagct ttttgagata gagagagaga tcctgcaact gtggtttgtc
2520

ttgctgcttg tacagcgaga gagacattga gagatatgta gatcgtttac c
2571

<210> 296
<211> 3893
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS000436

<400> 296
atgacaaaga tagtcacaat ccaaacagcc catagcctgg cgagtgcaaa tagatacgag
60

atctctggtg atatcacaac cgtccaaatt aattgcttgt ttcagcatca gccttttttgc
120

ataaagaagc tagcccaatc tgaaccacac actcacccgc cgcgtgacag cgccaaagac
180

aaaaccatca cccctcccca attccaaccc tctctctgcc tcacagaaat ctccccccctc
240

gcccaaaccc tcgccgccgc catggccgcc gccacctccc ccgccgtcgc attctcgggc
300

gccaccgccg ccgccatgcc caaacccgcc cgccatcctc tcccgcgcca ccagcccgtc
360

tcgcgccgcg cgctccccgc ccgcgtcgtc aggtgttgcg ccgcgtcccc cgccgccacc
420

tccgccgcgc ctcccgcaac cgcgctccgg ccctggggcc cgtccgagcc ccgcaagggc
480

gccgacatcc tcgtcgaggc gctcgagcgc tgcggcatcg tcgacgtctt cgcctacccc
540

ggcggcgcct ccatggagat ccaccaggcg ctgacgcgct cgcccgtcat caccaaccac
600

ctcttccgcc acgagcaggg ggaggcgttc gcggcgtccg gctacgcccg cgcgtccggc
660

cgcgtcggcg tctgcgtcgc cacctccggc ccgggggcca ccaacctcgt ctccgcgctc
720

gccgacgccc tcctcgactc catccccatg gtcgccatta ccgggcaagt gacccgccgc
780

atgatcggca cggacgcgtt ccaggagacg cccatagtgg aggtcacgcg ctccatcacc
840

aagcacaact acctggtcct tgacgtggag gatatccccc gcgtcatcca ggaagccttc
900

ttccttgcat cctctggccg cccggggccg gtgctagttg atatccccaa ggacatccag
960

cagcagatgg ctgtgcccgt ctgggacact ccaatgagtt tgccagggta catcgcccgc
1020

ctgcccaagc caccatctac tgaatcgctt gagcaggtcc tgcgtctggt tggcgagtca
1080

cggcgcccaa ttctgtatgt tggtggtggc tgcgctgcgt ctggcgagga gttgcgccgc
1140

tttgttgagc ttactgggat tccagttaca actactctga tgggccttgg caacttcccc
1200

agcgacgacc cactgtctct gcgcatgctt gggatgcatg gcactgtgta tgcaaattat
1260

gcagtagata aggctgacct gttgctcgca tttggtgtgc ggtttgatga tcgtgtgact
1320

gggaaaatcg aggcttttgc aagcaggtcc aagattgtgc acattgacat tgacccagct
1380

gagattggca agaacaagca gccacatgtc tccatttgtg cagatgttaa gcttgcttta
1440

caggggttga atgatctatt aaatgggagc aaagcacaac agggtctgga ttttggtcca 1500

tggcacaagg agttggatca gcagaagagg gagtttcctc taggattcaa gacttttggc 1560

gaggccatcc cgccgcaata tgctatccag gtactggatg agctgacaaa aggggaggcg 1620

atcattgcca ctggtgttgg gcagcaccag atgtgggcgg ctcagtatta cacttacaag 1680

cggccacggc agtggctgtc ttcgtctggt ttgggggcaa tgggatttgg gttaccagct 1740

gcagctggcg ctgctgtggc caacccaggt gttacagttg ttgacattga tggtgatggt 1800

agtttcctca tgaacattca ggagttggcg ttgatccgca ttgagaacct cccagtgaag 1860

gtgatgatat tgaacaacca gcatctggga atggtggtgc agtgggagga taggttttac 1920

aaggccaatc gggcgcacac ataccttggc aacccagaaa atgagagtga gatatatcca 1980

gattttgtga cgattgctaa aggattcaac gttccagcag ttcgagtgac gaagaagagc 2040

gaagtcactg cagcaatcaa gaagatgctt gagaccccag ggccatactt gttggatatc 2100

atagtcccgc atcaggagca cgtgctgcct atgatcccaa gcggtggtgc tttcaaggac 2160

atgatcatgg agggtgatgg caggacctcg tactgaaatt tcgacctaca agacctacaa 2220

gtgtgacatg cgcaatcagc atggtgcccg cgtgttgtat caactactag gggttcaact 2280

gtgaaccatg cgttttctag tttgcttgtt tcattcatat aagcttgtgt tacttagttc 2340

cgaaccctgt agctttgtag tctatgctct cttttgtagg gatgtgctgt cataagatat 2400

catgcaagtt tcttgtccta catatcaata ataagtactt ccatggaata attctcagtt 2460

ctgttttgaa ttttgcatct tctcacaaac agtgtgctgg ttcctttctg ttctacgccc 2520

gcgcgtccgg ccgcgtcggc gtctgcgtcg ccacctccgg cccgggggcc accaacctcg 2580

tctccgtagc gacttcgtgg gcgaggaaag cctttcgtcc aaggtggtcc ctcctcgcaa 2640

tcttgttgga tggtgaatat tataaaagcc tgcccttctc gcgggtgagt ccatgctcaa 2700

caccgtgcac tagggacagg attggccttt tgcagtttat ccactaggga caggattgca 2760

tcctgccgaa accctgccaa gcttgaggta gcctccaatt tgacggtgcc gccagcgacg 2820

ccgtctggaa ctgtccttttt tgaggaccac tccgtttgtc tagaggtacc tggagatcat 2880

gacattaagg atgaccagtt cgtaaaggtc ctgcggtgtc tattgctttt cataggttaa 2940

taagtgtttg ctagactgtg gtgaaaggcc gccttttgca gtttatctct agaaagactg 3000

gagttgcaga aagactcccg cccatccagg atgaggatga ccatatccga agtaaataaa 3060

accatcggac tctcgtataa gactgtcgac tcgaccggcc gacgcatagg ttcatttgaa 3120

gctgctattc tatttaaatt gaactcgact ccatccccat ggtcgccatc acgggccagg 3180

tcccccgccg catgatcggt agcgacttcg tgggcgagga aagcctttcg tccaaggtgg 3240

tccctcctcg caatcttgtt ggatggtgaa tattataaaa gcctgccctt ctcgcgggta 3300

agactcccgc ccatccagga tgaggatgac cagccttttg cagtttatcc actagggaca 3360

ggattgcatc ctgccgaaac cctgccaagc ttgaggtagc ctccaatttg acggtgccgc 3420

cagcgacgcc gtctggaact gtccttttg aggaccactc cgtttgactg gattttggtt 3480

ttaggaatta gaaattttat tgatagaagt attttacaaa tacaaataca tactaagggt 3540

ttcttatatg ctcaacacat gagcgaaacc ctataagaac cctaattccc ttatctggga 3600

actactcaca cattattctg gagaaaaata gagagagata gatttgtaga gagagactgg 3660

tgatttttgc ggactctatt agatctgggt aactggccta actggccttg gaggagctgg
3720

caactcaaaa tccctttgcc aaaaaccaac atcatgccat ccaccatgct tgtatccagc
3780

tgcgcgcaat gtaccccggg ctgtgtatcc caaagcctca tgcaacctaa cagatggatc
3840

gtttggaagg cctataacag caaccacaga cttaaaacct tgcgcctcca tag
3893

<210> 297
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AHASs653ZFN.F2 праймер

<400> 297
gcaatcaaga agatgcttga gacc
24

<210> 298
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AHASs653ZFN.R1 послідовність праймера

<400> 298
tcttttgtag ggatgtgctg tcat
24

<210> 299
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Прямий праймер pDAS434

<400> 299
gccaacccag gtgttacagt t
21

<210> 300
<211> 20
<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зворотний праймер pDAS434

<400> 300
ggctggtcat cctcatcctg
20

<210> 301
<211> 57
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер AHASs653ZFN.F2

<400> 301
acactctttc cctacacgac gctcttccga tctgcaatca agaagatgct tgagacc
57

<210> 302
<211> 57
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> AHASs653ZFN.R3 послідовність праймера

<400> 302
gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctcaagca aactagaaaa cgcatgg
57

<210> 303
<211> 11938
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> pDAS0000004

<400> 303
tgatcacagg cagcaacgct ctgtcatcgt tacaatcaac atgctaccct ccgcgagatc
60

atccgtgttt caaacccggc agcttagttg ccgttcttcc gaatagcatc ggtaacatga
120

gcaaagtctg ccgccttaca acggctctcc cgctgacgcc gtcccggact gatgggctgc
180

ctgtatcgag tggtgatttt gtgccgagct gccggtcggg gagctgttgg ctggctggtg
240

gcaggatata ttgtggtgta aacaaattga cgcttagaca acttaataac acattgcgga 300

cgtttttaat gtactgaatt aacgccgaat tgaattcgag ctcggtacca ctggattttg 360

gttttaggaa ttagaaattt tattgataga agtattttac aaatacaaat acatactaag 420

ggtttcttat atgctcaaca catgagcgaa accctataag aaccctaatt cccttatctg 480

ggaactactc acacattatt ctggagaaaa atagagagag atagatttgt agagagagac 540

tggtgatttt tgcggactct attagatctg ggtaactggc ctaactggcc ttggaggagc 600

tggcaactca aaatcccttt gccaaaaacc aacatcatgc catccaccat gcttgtatcc 660

agctgcgcgc aatgtacccc gggctgtgta tcccaaagcc tcatgcaacc taacagatgg 720

atcgtttgga aggcctataa cagcaaccac agacttaaaa ccttgcgcct ccatagactt 780

aagcaaatgt gtgtacaatg tggatcctag gcccaacctt tgatgcctat gtgacacgta 840

aacagtactc tcaactgtcc aatcgtaagc gttcctagcc ttccagggcc cagcgtaagc 900

aataccagcc acaacaccct caacctcagc aaccaaccaa gggtatctat cttgcaacct 960

ctcgagatca tcaatccact cttgtggtgt ttgtggctct gtcctaaagt tcactgtaga 1020

cgtctcaatg taatggttaa cgatatcaca aaccgcggcc atatcagctg ctgtagctgg 1080

cctaatctca actggtctcc tctccggaga catggcttct acctacaaaa aagctccgca 1140

cgaggctgca tttgtcacaa atcatgaaaa gaaaaactac cgatgaacaa tgctgaggga 1200

ttcaaattct acccacaaaa agaagaaaga aagatctagc acatctaagc ctgacgaagc 1260

agcagaaata tataaaaata taaaccatag tgccctttc ccctcttcct gatcttgttt 1320

agcatggcgg aaattttaaa ccccccatca tctcccccaa caacggcgga tcgcagatct 1380

acatccgaga gccccattcc ccgcgagatc cgggccggat ccacgccggc gagagcccca 1440

gccgcgagat cccgcccctc ccgcgcaccg atctgggcgc gcacgaagcc gcctctcgcc 1500

cacccaaact accaaggcca aagatcgaga ccgagacgga aaaaaaaaac ggagaaagaa 1560

agaggagagg ggcggggtgg ttaccggcgc ggcggcggcg gaggggggagg ggggaggagc 1620

tcgtcgtccg gcagcgaggg gggaggaggt ggaggtggtg gtggtggtgg tggtagggtt 1680

ggggggatgg gaggagaggg gggggtatgt atatagtggc gatgggggggc gtttctttgg 1740

aagcggaggg agggccggcc tcgtcgctgg ctcgcgatcc tcctcgcgtt tccggccccc 1800

acgacccgga cccacctgct gtttttttctt tttctttttt ttctttcttt ttttttttttt 1860

ggctgcgaga cgtgcggtgc gtgcggacaa ctcacggtga tagtgggggg gtgtggagac 1920

tattgtccag ttggctggac tggggtgggt tgggttgggt tgggttgggc tgggcttgct 1980

atggatcgtg gatagcactt tgggctttag gaactttagg ggttgttttt gtaaatgttt 2040

tgagtctaag tttatctttt atttttacta gaaaaaatac ccatgcgctg caacggggga 2100

aagctatttt aatcttatta ttgttcattg tgagaattcg cctgaatata tatttttctc 2160

aaaaattatg tcaaattagc atatgggttt ttttaaagat atttcttata caaatccctc 2220

tgtatttaca aaagcaaacg aacttaaaac ccgactcaaa tacagatatg catttccaaa 2280

agcgaataaa cttaaaaacc aattcataca aaaatgacgt atcaaagtac cgacaaaaac 2340

atcctcaatt tttataatag tagaaaagag taaatttcac tttgggccac cttttattac 2400

cgatatttta ctttatacca ccttttaact gatgttttca cttttgacca ggtaatctta 2460

cctttgtttt attttggact atcccgactc tcttctcaag catatgaatg acctcgagta 2520

tgctagtcta gagtcgacct gcaggcatgc aagcttagct tgagcttgga tcagattgtc 2580

gtttcccgcc ttcagtttat cacaagtttg tacaaaaaag caggctctgc agtgcagcgt 2640

gacccggtcg tgcccctctc tagagataat gagcattgca tgtctaagtt ataaaaaatt 2700

accacatatt ttttttgtca cacttgtttg aagtgcagtt tatctatctt tatacatata 2760

tttaaacttt actctacgaa taatataatc tatagtacta caataatatc agtgttttag 2820

agaatcatat aaatgaacag ttagacatgg tctaaaggac aattgagtat tttgacaaca 2880

ggactctaca gttttatctt tttagtgtgc atgtgttctc ctttttttt gcaaatagct 2940

tcacctatat aatacttcat ccattttatt agtacatcca tttagggttt agggttaatg 3000

gtttttatag actaatttt ttagtacatc tattttattc tattttagcc tctaaattaa 3060

gaaaactaaa actctatttt agtttttta tttaataatt tagatataaa atagaataaa 3120

ataaagtgac taaaaattaa acaaataccc tttaagaaat taaaaaaact aaggaaacat 3180

ttttcttgtt tcgagtagat aatgccagcc tgttaaacgc cgtcgacgag tctaacggac 3240

accaaccagc gaaccagcag cgtcgcgtcg ggccaagcga agcagacggc acggcatctc 3300

tgtcgctgcc tctggacccc tctcgagagt tccgctccac cgttggactt gctccgctgt 3360

cggcatccag aaattgcgtg gcggagcggc agacgtgagc cggcacggca ggcggcctcc 3420

tcctcctctc acggcacggc agctacgggg gattcctttc ccaccgctcc ttcgctttcc 3480

cttcctcgcc cgccgtaata aatagacacc ccctccacac cctctttccc caacctcgtg 3540

ttgttcggag cgcacacaca cacaaccaga tctcccccaa atccacccgt cggcacctcc 3600

gcttcaaggt acgccgctcg tcctcccccc ccccccctct ctaccttctc tagatcggcg 3660

ttccggtcca tggttagggc ccggtagttc tacttctgtt catgtttgtg ttagatccgt 3720

gtttgtgtta gatccgtgct gctagcgttc gtacacggat gcgacctgta cgtcagacac 3780

gttctgattg ctaacttgcc agtgtttctc tttggggaat cctgggatgg ctctagccgt 3840

tccgcagacg ggatcgattt catgattttt tttgtttcgt tgcatagggt ttggtttgcc 3900

cttttccttt atttcaatat atgccgtgca cttgtttgtc gggtcatctt ttcatgcttt 3960

tttttgtctt ggttgtgatg atgtggtctg gttgggcggt cgttctagat cggagtagaa 4020

ttctgtttca aactacctgg tggatttatt aattttggat ctgtatgtgt gtgccataca 4080

tattcatagt tacgaattga agatgatgga tggaaatatc gatctaggat aggtatacat 4140

gttgatgcgg gttttactga tgcatataca gagatgcttt ttgttcgctt ggttgtgatg 4200

atgtggtgtg gttgggcggt cgttcattcg ttctagatcg gagtagaata ctgtttcaaa 4260

ctacctggtg tatttattaa ttttggaact gtatgtgtgt gtcatacatc ttcatagtta 4320

cgagtttaag atggatggaa atatcgatct aggataggta tacatgttga tgtgggtttt 4380

actgatgcat atacatgatg gcatatgcag catctattca tatgctctaa ccttgagtac 4440

ctatctatta taataaacaa gtatgtttta taattatttt gatcttgata tacttggatg 4500

atggcatatg cagcagctat atgtggattt ttttagccct gccttcatac gctatttatt 4560

tgcttggtac tgtttctttt gtcgatgctc accctgttgt ttggtgttac ttctgcagga 4620

tggcctcctc cgagaacgtg atcaccgagt tcatgcgctt caaggtgcgc atggagggca 4680

ccgtgaacgg ccacgagttc gagatcgagg gcgaggggga gggcaggcca tacgagggcc 4740

acaacaccgt gaagctcaag gtgaccaagg gaggcccact cccattcgcc tgggacatcc 4800

tcagcccaca gttccagtac ggctccaagg tgtacgtgaa gcacccagcc gacatcccag 4860

actacaagaa gctcagcttc ccagagggct tcaagtggga gcgcgtgatg aacttcgagg 4920

acggcggcgt ggccaccgtg acccaagact ccagcctcca ggacggctgc ttcatctaca 4980

aggtgaagtt catcggcgtg aacttcccat ccgacggccc agtgatgcaa aagaagacca 5040

tgggctggga ggcctccacc gagaggctct acccaaggga cggcgtgctc aagggcgaga 5100

cccacaaggc cctcaagctc aaggacggcg gccactacct cgtcgagttc aagtccatct 5160

acatggccaa gaagccagtc cagctcccag gctactacta cgtggacgcc aagctcgaca 5220

tcacctccca caacgaggac tacaccatcg tcgagcagta cgagcgcacc gagggccgcc 5280

accacctgtt cctctgaaga aggagtgcgt cgaagcagat cgttcaaaca tttggcaata 5340

aagtttctta agattgaatc ctgttgccgg tcttgcgatg attatcatat aatttctgtt 5400

gaattacgtt aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt 5460

ttttatgatt agagtcccgc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aaatatagcg 5520

cgcaaactag gataaattat cgcgcgcggt gtcatctatg ttactagatc gaacccagct 5580

ttcttgtaca aagtggtgat aaactatcag tgtttgacag gatatattgg cgggtaaacc 5640

taagagaaaa gagcgtttat tagaataatc ggatatttaa aagggcgtga aaaggtttat 5700

ccgttcgtcc atttgtatgt gcatgccaac cacagggttc ccctcgggat caaagtactt 5760

taaagtactt taaagtactt taaagtactt tgatccaacc cctccgctgc tatagtgcag
5820

tcggcttctg acgttcagtg cagccgtctt ctgaaaacga catgtcgcac aagtcctaag
5880

ttacgcgaca ggctgccgcc ctgccctttt cctggcgttt tcttgtcgcg tgttttagtc
5940

gcataaagta gaatacttgc gactagaacc ggagacatta cgccatgaac aagagcgccg
6000

ccgctggcct gctgggctat gcccgcgtca gcaccgacga ccaggacttg accaaccaac
6060

gggccgaact gcacgcggcc ggctgcacca agctgttttc cgagaagatc accggcacca
6120

ggcgcgaccg cccggagctg gccaggatgc ttgaccacct acgccctggc gacgttgtga
6180

cagtgaccag gctagaccgc ctggcccgca gcacccgcga cctactggac attgccgagc
6240

gcatccagga ggccggcgcg ggcctgcgta gcctggcaga gccgtgggcc gacaccacca
6300

cgccggccgg ccgcatggtg ttgaccgtgt tcgccggcat tgccgagttc gagcgttccc
6360

taatcatcga ccgcacccgg agcgggcgcg aggccgccaa ggcccgaggc gtgaagtttg
6420

gcccccgccc taccctcacc ccggcacaga tcgcgcacgc ccgcgagctg atcgaccagg
6480

aaggccgcac cgtgaaagag gcggctgcac tgcttggcgt gcatcgctcg accctgtacc
6540

gcgcacttga gcgcagcgag gaagtgacgc ccaccgaggc caggcggcgc ggtgccttcc
6600

gtgaggacgc attgaccgag gccgacgccc tggcggccgc cgagaatgaa cgccaagagg
6660

aacaagcatg aaaccgcacc aggacggcca ggacgaaccg tttttcatta ccgaagagat
6720

cgaggcggag atgatcgcgg ccgggtacgt gttcgagccg cccgcgcacg tctcaaccgt
6780

gcggctgcat gaaatcctgg ccggtttgtc tgatgccaag ctggcggcct ggccggccag
6840

cttggccgct gaagaaaccg agcgccgccg tctaaaaagg tgatgtgtat ttgagtaaaa
6900

cagcttgcgt catgcggtcg ctgcgtatat gatgcgatga gtaaataaac aaatacgcaa 6960

ggggaacgca tgaaggttat cgctgtactt aaccagaaag gcgggtcagg caagacgacc 7020

atcgcaaccc atctagcccg cgccctgcaa ctcgccgggg ccgatgttct gttagtcgat 7080

tccgatcccc agggcagtgc ccgcgattgg gcggccgtgc gggaagatca accgctaacc 7140

gttgtcggca tcgaccgccc gacgattgac cgcgacgtga aggccatcgg ccggcgcgac 7200

ttcgtagtga tcgacggagc gccccaggcg gcggacttgg ctgtgtccgc gatcaaggca 7260

gccgacttcg tgctgattcc ggtgcagcca agcccttacg acatatgggc caccgccgac 7320

ctggtggagc tggttaagca gcgcattgag gtcacggatg gaaggctaca agcggccttt 7380

gtcgtgtcgc gggcgatcaa aggcacgcgc atcggcggtg aggttgccga ggcgctggcc 7440

gggtacgagc tgcccattct tgagtcccgt atcacgcagc gcgtgagcta cccaggcact 7500

gccgccgccg gcacaaccgt tcttgaatca gaacccgagg gcgacgctgc ccgcgaggtc 7560

caggcgctgg ccgctgaaat taaatcaaaa ctcatttgag ttaatgaggt aaagagaaaa 7620

tgagcaaaag cacaaacacg ctaagtgccg gccgtccgag cgcacgcagc agcaaggctg 7680

caacgttggc cagcctggca gacacgccag ccatgaagcg ggtcaacttt cagttgccgg 7740

cggaggatca caccaagctg aagatgtacg cggtacgcca aggcaagacc attaccgagc 7800

tgctatctga atacatcgcg cagctaccag agtaaatgag caaatgaata aatgagtaga 7860

tgaattttag cggctaaagg aggcggcatg gaaaatcaag aacaaccagg caccgacgcc 7920

gtggaatgcc ccatgtgtgg aggaacgggc ggttggccag gcgtaagcgg ctgggttgtc 7980

tgccggccct gcaatggcac tggaaccccc aagcccgagg aatcggcgtg agcggtcgca 8040

aaccatccgg cccggtacaa atcggcgcgg cgctgggtga tgacctggtg gagaagttga 8100

aggccgcgca ggccgcccag cggcaacgca tcgaggcaga agcacgcccc ggtgaatcgt 8160

ggcaagcggc cgctgatcga atccgcaaag aatcccggca accgccggca gccggtgcgc 8220

cgtcgattag gaagccgccc aagggcgacg agcaaccaga ttttttcgtt ccgatgctct 8280

atgacgtggg cacccgcgat agtcgcagca tcatggacgt ggccgttttc cgtctgtcga 8340

agcgtgaccg acgagctggc gaggtgatcc gctacgagct tccagacggg cacgtagagg 8400

tttccgcagg gccggccggc atggccagtg tgtgggatta cgacctggta ctgatggcgg 8460

tttcccatct aaccgaatcc atgaaccgat accgggaagg gaagggagac aagcccggcc 8520

gcgtgttccg tccacacgtt gcggacgtac tcaagttctg ccggcgagcc gatggcggaa 8580

agcagaaaga cgacctggta gaaacctgca ttcggttaaa caccacgcac gttgccatgc 8640

agcgtacgaa gaaggccaag aacggccgcc tggtgacggt atccgagggt gaagccttga 8700

ttagccgcta caagatcgta aagagcgaaa ccgggcggcc ggagtacatc gagatcgagc 8760

tagctgattg gatgtaccgc gagatcacag aaggcaagaa cccggacgtg ctgacggttc 8820

accccgatta ctttttgatc gatcccggca tcggccgttt tctctaccgc ctggcacgcc 8880

gcgccgcagg caaggcagaa gccagatggt tgttcaagac gatctacgaa cgcagtggca 8940

gcgccggaga gttcaagaag ttctgtttca ccgtgcgcaa gctgatcggg tcaaatgacc 9000

tgccggagta cgatttgaag gaggaggcgg ggcaggctgg cccgatccta gtcatgcgct 9060

accgcaacct gatcgagggc gaagcatccg ccggttccta atgtacggag cagatgctag 9120

ggcaaattgc cctagcaggg gaaaaaggtc gaaaaggtct ctttcctgtg gatagcacgt 9180

acattgggaa cccaaagccg tacattggga accggaaccc gtacattggg aacccaaagc 9240

cgtacattgg gaaccggtca cacatgtaag tgactgatat aaaagagaaa aaaggcgatt 9300

tttccgccta aaactcttta aaacttatta aaactcttaa aacccgcctg gcctgtgcat 9360

aactgtctgg ccagcgcaca gccgaagagc tgcaaaaagc gcctaccctt cggtcgctgc 9420

gctccctacg ccccgccgct tcgcgtcggc ctatcgcggc cgctggccgc tcaaaaatgg 9480

ctggcctacg gccaggcaat ctaccagggc gcggacaagc cgcgccgtcg ccactcgacc 9540

gccggcgccc acatcaaggc accctgcctc gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc 9600

tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga 9660

caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt ggcgggtgtc ggggcgcagc catgacccag 9720

tcacgtagcg atagcggagt gtatactggc ttaactatgc ggcatcagag cagattgtac 9780

tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca 9840

tcaggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcgtt cggctgcggc 9900

gagcggtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg 9960

caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt 10020

tgctggcgtt tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa 10080

gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct 10140

ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc 10200

cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg
10260

tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccccgt tcagcccgac cgctgcgcct
10320

tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag
10380

cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga
10440

agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga
10500

agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg
10560

gtagcggtgg ttttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag
10620

aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag
10680

ggattttggt catgcatgat atatctccca atttgtgtag ggcttattat gcacgcttaa
10740

aaataataaa agcagacttg acctgatagt ttggctgtga gcaattatgt gcttagtgca
10800

tctaacgctt gagttaagcc gcgccgcgaa gcggcgtcgg cttgaacgaa tttctagcta
10860

gacattattt gccgactacc ttggtgatct cgcctttcac gtagtggaca aattcttcca
10920

actgatctgc gcgcgaggcc aagcgatctt cttcttgtcc aagataagcc tgtctagctt
10980

caagtatgac gggctgatac tgggccggca ggcgctccat tgcccagtcg gcagcgacat
11040

ccttcggcgc gattttgccg gttactgcgc tgtaccaaat gcgggacaac gtaagcacta
11100

catttcgctc atcgccagcc cagtcgggcg gcgagttcca tagcgttaag gtttcattta
11160

gcgcctcaaa tagatcctgt tcaggaaccg gatcaaagag ttcctccgcc gctggaccta
11220

ccaaggcaac gctatgttct cttgcttttg tcagcaagat agccagatca atgtcgatcg
11280

tggctggctc gaagatacct gcaagaatgt cattgcgctg ccattctcca aattgcagtt
11340

cgcgcttagc tggataacgc cacggaatga tgtcgtcgtg cacaacaatg gtgacttcta 11400

cagcgcggag aatctcgctc tctccagggg aagccgaagt ttccaaaagg tcgttgatca 11460

aagctcgccg cgttgtttca tcaagcctta cggtcaccgt aaccagcaaa tcaatatcac 11520

tgtgtggctt caggccgcca tccactgcgg agccgtacaa atgtacggcc agcaacgtcg 11580

gttcgagatg gcgctcgatg acgccaacta cctctgatag ttgagtcgat acttcggcga 11640

tcaccgcttc ccccatgatg tttaactttg ttttagggcg actgccctgc tgcgtaacat 11700

cgttgctgct ccataacatc aaacatcgac ccacggcgta acgcgcttgc tgcttggatg 11760

cccgaggcat agactgtacc ccaaaaaaac agtcataaca agccatgaaa accgccactg 11820

cgccgttacc accgctgcgt tcggtcaagg ttctggacca gttgcgtgag cgcatacgct 11880

acttgcatta cagcttacga accgaacagg cttatgtcca ctgggttcgt gcccgaat 11938

<210> 304
<211> 341
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> yc06-9110-1 (A-геном ; алель дикого типа)

<400> 304
gcaatcaaga agatgcttga gaccccaggg ccatacttgt tggatatcat cgtcccgcat 60

caggagcacg tgctgcctat gatcccaagc ggtggtgctt tcaaggacat gatcatggag 120

ggtgatggca ggacctcgta ctgaaatttc gacctacaag acctacaagt gtgacatgcg 180

caatcagcat ggtgcccgcg tgttgtatca actactaggg gttcaactgt gaaccatgcg 240

ttttctagtt tgcttgtttc attcatataa gcttgtgtta cttagttccg aaccctgtag 300

ctttgtagtc tatgctctct tttgtaggga tgtgctgtca t
341

<210> 305
<211> 341
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> yc06-9110-1 (A-геном ; алель дикого типа)

<400> 305
gcaatcaaga agatgcttga gaccccaggg ccatacttgt tggatatcat cgtcccgcat
60

caggagcacg tgctgcctat gatcccaagc ggtggtgctt tcaaggacat gatcatggag
120

ggtgatggca ggacctcgta ctgaaatttc gacctacaag acctacaagt gtgacatgcg
180

caatcagcat ggtgcccgcg tgttgtatca actactaggg gttcaactgt gaaccatgcg
240

ttttctagtt tgcttgtttc attcatataa gcttgtgtta cttagttccg aaccctgtag
300

ctttgtagtc tatgctctct tttgtaggga tgtgctgtca t
341

<210> 306
<211> 341
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> yc06-9110-1 (B-геном ; алель дикого типа)

<400> 306
gcaatcaaga agatgcttga gaccccaggg ccatacttgt tggatatcat cgtcccgcat
60

caggagcacg tgctgcctat gatcccaagc ggtggtgctt tcaaggacat gatcatggag
120

ggtgatggca ggacctcgta ctgaaatttc gacctacaag acctacaagt gtgacatgcg
180

caatcagcat ggtgcccgcg tgttgtatca actactaggg gttcaactgt gaaccatgcg
240

ttttctagtt tgcttgtttc attcatataa gcttgtgtta cttagttccg aaccctgtag
300

ctttgtagtc tatgctctct tttgtaggga tgtgctgtca t
341

<210> 307
<211> 440
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> yc06-9110-1 (B-геном ; алель дикого типа)

<400> 307
gcaatcaaga agatgcttga gaccccaggg ccatacttgt tggatatcat tgtcccgcat
60

caggagcacg tgctgcctat gattcccaat ggcggcgctt tcaaggacat gatcatggag
120

ggtgatggca ggacctcgta ctgaaatggt ccgaagtcca cgccgccaac tacgagtatg
180

atcccaagcg gtggtgcttt taaggacatg atcatggagg gtgatggcag gacctcgtac
240

tgaaatttcg acctacaaga cctacaagtg tgacatgcgc aatcagcatg atacctgcgt
300

gttgtatcaa ctactggggg ttcaactgtg aaccatgcgt tttctagttt gcttgtttca
360

ttcatataag cttgtgttac ttagttccga accgtgtagt tttgtagtct ctgttctctt
420

ttgtagggat gtgctgtcat
440

<210> 308
<211> 346
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> yc06-9110-1 (D-геном ; алель дикого типа)

<400> 308
gcaatcaaga agatgcttga gaccccaggg ccatacttgt tggatatcat agtcccgcat
60

caggagcacg tgctgcctat gatcccaagc ggtggtgctt tcaaggacat gatcatggag
120

ggtgatggca ggacctcgta ctgaaatttc gacctacaag acctacaagt gtgacatgcg
180

caatcagcat gatgcccgcg tgttgtatca actactaggg gttcaactgt gagccatgcg
240

ttttctagtt tgcttgtttc attcatataa gcttgtatta cttagttccg aaccctgtag
300

ttttgtagtc tatgttctct tttgtaggga tgtgctgtca taagat
346

<210> 309
<211> 346
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> yc06-9110-1 (D-геном ; алель дикого типа)

<400> 309
gcaatcaaga agatgcttga gaccccaggg ccatacttgt tggatatcat agtcccgcat
60

caggagcacg tgctgcctat gatcccaagc ggtggtgctt tcaaggacat gatcatggag
120

ggtgatggca ggacctcgta ctgaaatttc gacctacaag acctacaagt gtgacatgcg
180

caatcagcat gatgcccgcg tgttgtatca actactaggg gttcaactgt gagccatgcg
240

ttttctagtt tgcttgtttc attcatataa gcttgtatta cttagttccg aaccctgtag
300

ttttgtagtc tatgttctct tttgtaggga tgtgctgtca taagat
346

<210> 310
<211> 437
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> yr00-9311-1 (A-геном ; ED алель)

<400> 310
gcaatcaaga agatgcttga gaccccaggg ccatacttgt tggatatcat cgtcccgcat
60

caggagcacg tgctgcctat gattcccaat ggcggcgctt tcaaggacat gatcatggag
120

ggtgatggca ggacctcgta ctgaaatggt ccgaaggtcc caagcggtgg tgctttcaag
180

gacatgatca tggagggtga tggcaggacc tcgtactgaa atttcgacct acaagaccta
240

cgacctacaa gacctacaag tgtgacatgc gcaatcagca tggtgcccgc gtgttgtatc
300

aactactagg ggttcaactg tgaaccatgc gttttctagt ttgcttgttt cattcatata
360

agcttgtgtt acttagttcc gaaccctgta gctttgtagt ctatgctctc ttttgtaggg
420

atgtgctgtc ataagat
437

<210> 311
<211> 387
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> yr00-9311-1 (A-геном ; ED алель)

<400> 311
gcaatcaaga agatgcttga gaccccaggg ccatacttgt tggatatcat cgtcccgcat
60

caggagcacg tgctgcccca tcaccctcca tgatcatgtc cttgaaagcg ccgcattggg
120

aataataatc ccaagcggtg gtgctttcaa ggacatgatc atggagggtg atggcaggac
180

ctcgtactga aatttcgacc tacaagacct acaagtgtga catgcgcaat cagcatggtg
240

cccgcgtgtt gtatcaacta ctaggggttc aactgtgaac catgcgtttt ctagtttgct
300

tgtttcattc atataagctt gtgttactta gttccgaacc ctgtagcttt gtagtctatg
360

ctctcttttg tagggatgtg ctgtcat
387

<210> 312
<211> 346
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> yr00-9311-1 (D-геном ; алель дикого типа)

<400> 312

gcaatcaaga agatgcttga gaccccaggg ccatacttgt tggatatcat agtcccgcat
60

caggagcacg tgctgcctat gatcccaagc ggtggtgctt tcaaggacat gatcatggag
120

ggtgatggca ggacctcgta ctgaaatttc gacctacaag acctacaagt gtgacatgcg
180

caatcagcat gatgcccgcg tgttgtatca actactaggg gttcaactgt gagccatgcg
240

ttttctagtt tgcttgtttc attcatataa gcttgtatta cttagttccg aaccctgtag
300

ttttgtagtc tatgttctct tttgtaggga tgtgctgtca taagat
346

<210> 313
<211> 346
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> yr00-9311-1 (D-геном ; алель дикого типа)

<400> 313
gcaatcaaga agatgcttga gaccccaggg ccatacttgt tggatatcat agtcccgcat
60

caggagcacg tgctgcctat gatcccaagc ggtggtgctt tcaaggacat gatcatggag
120

ggtgatggca ggacctcgta ctgaaatttc gacctacaag acctacaagt gtgacatgcg
180

caatcagcat gatgcccgcg tgttgtatca actactaggg gttcaactgt gagccatgcg
240

ttttctagtt tgcttgtttc attcatataa gcttgtatta cttagttccg aaccctgtag
300

ttttgtagtc tatgttctct tttgtaggga tgtgctgtca taagat
346

<210> 314
<211> 3336
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> QA_pDAS000434

<400> 314

ccactcttgc cctacacgac actgaagacc ttatgattcc aaacggcggc gccttcaagg 60

acatgatcat ggagggtgat ggcaggacct cgtactgaaa tttcgaccta caagacctac 120

aagtgtgaca tgcgcaatca gcatggtgcc cgcgtgttgt atcaactact aggggttcaa 180

ctgtgaacca tgcgttttct agtttgcttg tttcattcat ataagcttgt gttacttagt 240

tccgaaccct gtagctttgt agtctatgct ctcttttgta gggatgtgct gtcataagat 300

atcatgcaag tttcttgtcc tacatatcaa taataagtac ttccatggaa taattctcag 360

ttctgttttg aattttgcat cttctcacaa acagtgtgct ggttcctttc tgttcgctga 420

cgccctcctc gactccatcc ccatggtcgc catcacgggc caggtccccc gccgcatgat 480

cggtagcgac ttcgtgggcg aggaaagcct ttcgtccaag gtggtccctc ctcgcaatct 540

tgttggatgg tgaatattat aaaagcctgc ccttctcgcg ggtaagactc ccgcccatcc 600

aggatgagga tgaccagcct tttgcagttt atccactagg gacaggattg catcctgccg 660

aaaccctgcc aagcttgagg tagcctccaa tttgacggtg ccgccagcga cgccgtctgg 720

aactgtcctt tttgaggacc actccgtttg tctagactag catactcgag gtcattcata 780

tgcttgagaa gagagtcggg atagtccaaa ataaaacaaa ggtaagatta cctggtcaaa 840

agtgaaaaca tcagttaaaa ggtggtataa agtaaaatat cggtaataaa aggtggccca 900

aagtgaaatt tactcttttc tactattata aaaattgagg atgtttttgt cggtactttg 960

atacgtcatt tttgtatgaa ttggttttta agtttattcg cttttggaaa tgcatatctg 1020

tatttgagtc gggttttaag ttcgtttgct tttgtaaata cagagggatt tgtataagaa 1080

atatctttaa aaaaacccat atgctaattt gacataattt ttgagaaaaa tatatattca 1140

ggcgaattct cacaatgaac aataataaga ttaaaatagc tttcccccgt tgcagcgcat 1200

gggtattttt tctagtaaaa ataaaagata aacttagact caaaacattt acaaaaacaa 1260

cccctaaagt tcctaaagcc caaagtgcta tccacgatcc atagcaagcc cagcccaacc 1320

caacccaacc caacccaccc cagtccagcc aactggacaa tagtctccac acccccccac 1380

tatcaccgtg agttgtccgc acgcaccgca cgtctcgcag ccaaaaaaaa aaaaagaaag 1440

aaaaaaaaga aaaagaaaaa acagcaggtg ggtccgggtc gtgggggccg gaaacgcgag 1500

gaggatcgcg agccagcgac gaggccggcc ctccctccgc ttccaaagaa acgccccca 1560

tcgccactat atacataccc ccccctctcc tcccatcccc ccaaccctac caccaccacc 1620

accaccacct ccacctcctc ccccctcgct gccggacgac gagctcctcc cccctccccc 1680

tccgccgccg ccgcgccggt aaccaccccg cccctctcct ctttctttct ccgttttttt 1740

tttccgtctc ggtctcgatc tttggccttg gtagtttggg tgggcgagag gcggcttcgt 1800

gcgcgcccag atcggtgcgc gggaggggcg ggatctcgcg gctggggctc tcgccggcgt 1860

ggatccggcc cggatctcgc ggggaatggg gctctcggat gtagatctgc gatccgccgt 1920

tgttgggggа gatgatgggg ggtttaaaat ttccgccatg ctaaacaaga tcaggaagag 1980

gggaaaaggg cactatggtt tatatttta tatatttctg ctgcttcgtc aggcttagat 2040

gtgctagatc tttctttctt ctttttgtgg gtagaatttg aatccctcag cattgttcat 2100

cggtagtttt tcttttcatg atttgtgaca aatgcagcct cgtgcggagc ttttttgtag 2160

gtagaagcca tgtctccgga gaggagacca gttgagatta ggccagctac agcagctgat 2220

atggccgcgg tttgtgatat cgttaaccat tacattgaga cgtctacagt gaactttagg
2280

acagagccac aaacaccaca agagtggatt gatgatctcg agaggttgca agatagatac
2340

ccttggttgg ttgctgaggt tgagggtgtt gtggctggta ttgcttacgc tgggccctgg
2400

aaggctagga acgcttacga ttggacagtt gagagtactg tttacgtgtc acataggcat
2460

caaaggttgg gcctaggatc cacattgtac acacatttgc ttaagtctat ggaggcgcaa
2520

ggttttaagt ctgtggttgc tgttataggc cttccaaacg atccatctgt taggttgcat
2580

gaggctttgg gatacacagc ccggggtaca ttgcgcgcag ctggatacaa gcatggtgga
2640

tggcatgatg ttggtttttg gcaaagggat tttgagttgc cagctcctcc aaggccagtt
2700

aggccagtta cccagatcta atagagtccg caaaaatcac cagtctctct ctacaaatct
2760

atctctctct atttttctcc agaataatgt gtgagtagtt cccagataag ggaattaggg
2820

ttcttatagg gtttcgctca tgtgttgagc atataagaaa cccttagtat gtatttgtat
2880

ttgtaaaata cttctatcaa taaaatttct aattcctaaa accaaaatcc agtggtacct
2940

ggagatcatg acattaagga tgaccagttc gtaaaggtcc tgcggtgtct attgcttttc
3000

ataggttaat aagtgtttgc tagactgtgg tgaaaggcca agactcccgc ccatctctct
3060

atgcccggga caagtgccac cccacagtgg ggcaggatga ggatgaccaa agactcccgc
3120

ccatctcact agggacagga ttggcctttt gcagtttatc tctatgcccg ggacaagtgt
3180

atccgaagta aataaaacca tcggactctc gtataagact gtcgactcga ccggccgacg
3240

cataggttca tttgaagctg ctattctatt taaattgaaa ctcggacggt agcagtgtgg
3300

tatgaggtct tcagcacact cggtaactcc agtcac
3336

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Рослинна клітина із підвищеною толерантністю до гербіциду на основі імідазолінону або сульфонілсечовини в порівнянні з рослинною клітиною, яка не була генетично модифікованою, де рослинна клітина включає націлену геномну модифікацію одного або більше алелів ендогенного гена синтази ацетогідроксикислоти (AHAS) в рослинній клітині, де рослинна клітина включає сайт-специфічну нуклеазу "цинкові пальці", яка зв'язується з послідовністю, яка включає цільовий сайт, як показано в будь-якій з SEQ ID NO: 35-56 або 263-278, сайт-специфічна нуклеаза "цинкові пальці" включає від чотирьох до шести доменів "цинкові пальці", кожен домен "цинкові пальці" включає спіральну ділянку впізнання, де

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 181, 182, 183, 184 і 185, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 35;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 186, 187, 188, 189, 190 і 191, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 36;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 182, 183, 184, 185, 192 і 193, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 37;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 182, 183, 184, 185, 194 і 195, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 38;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 196, 197, 198, 199 і 200, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 39;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 201, 202, 186, 187, 188 і 189, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 40;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 184, 185, 194, 195, 203 і 204, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 41;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 201, 202, 196, 197 і 198, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 42;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 205, 206, 199, 207, 199 і 208, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 43;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 194, 209, 210, 211 і 212, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 44;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 213, 214, 182, 215 і 216, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 45;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 205, 217, 218, 219 і 220, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 46;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 221, 222, 199, 207 і 184, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 47;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 223, 224, 225 і 226, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 48;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 227, 228, 229, 230 і 231, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 49;

нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 223, 224, 225 і 226, і розщеплює в або біля цільового сайта

SEQ ID NO: 50;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 184, 232, 233, 234 і 186, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 51;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 204, 223, 224, 225 або 226, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 52;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 204, 223, 192 і 235, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 53;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 184, 232, 233, 234 і 34, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 54;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 184, 33, 233, 32 і 223, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 55;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 31, 30, 192, 29, 233 і 28, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 56;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 227, 182, 236 і 237, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 263;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 184, 238, 182, 239 і 240, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 264;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 241, 242, 243, 233 і 244, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 265;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 184, 245, 182, 246, 227 і 247, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 266;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 227, 198, 237, 182, 218 і 248, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 267;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 219, 249, 210, 250, 237 і 224, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 268;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 237, 182, 218, 248 і 198, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 269;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 249, 73, 201, 216, 233 і 251, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 270;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 218, 248, 233, 184 і 198, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 271;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 237, 249, 252, 253 і 216, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 272;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 254, 255, 224, 256 і 205, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 273;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 252, 253, 203, 254, 237 і 224, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 274;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 255, 224, 256, 205, 249 і 257, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 275;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 224, 252, 253, 203 і 254, і розщеплює в або біля цільового

сайта SEQ ID NO: 276;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 258, 254, 221, 259, 260 і 261, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 277; або
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 216, 259, 218, 219 і 262, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 278,
і де геномна модифікація являє собою інсерцію та/або делецію, яка продукує S653N або P197S мутацію в ендогенному гені або інтегрує екзогенну послідовність в AHAS ген, таким чином, що генетично модифікований AHAS ген продукує продукт, який приводить до одержання рослинної клітини, толерантної до гербіциду на основі імідазолінону або сульфонілсечовини.

2. Рослинна клітина за пунктом 1, де геномна модифікація включає інтеграцію двох або більше екзогенних послідовностей.

3. Рослинна клітина за пунктом 1 або пунктом 2, де геномна модифікація включає S653N мутацію до AHAS гена, яка надає толерантність до гербіцидів на основі імідазолінонів.

4. Рослинна клітина за будь-яким з пунктів 1-3, де рослинна клітина являє собою поліплоїдну рослинну клітину.

5. Рослинна клітина за будь-яким з пунктів 1-4, де рослина є вибраною з групи, що складається з пшениці, сої, кукурудзи, картоплі, люцерни, рису, ячменю, соняшника, томата, *Arabidopsis*, бавовнику, видів *Brassica* та тимофіївки лугової.

6. Рослина, частина рослини, насіння або плід, що включає одну або більше рослинних клітин за будь-яким з пунктів 1 - 5 .

7. Спосіб одержання рослинної клітини згідно з будь-яким з пунктів 1 - 5 , де спосіб включає:
експресію однієї або більше сайт-специфічних нуклеаз "цинкові пальці", як визначено в п. 1, в рослинній клітині для модифікації ендогенної AHAS послідовності за допомогою мутації в S653N або P197S в присутності однієї або більше екзогенних послідовностей; і
де одна або більше екзогенних послідовностей інтегровані в AHAS ген за допомогою нуклеаз "цинкові пальці".

8. Нуклеаза "цинкові пальці" для застосування для розщеплення AHAS гена рослини, де нуклеаза "цинкові пальці" включає від чотирьох до шести доменів "цинкові пальці", кожен домен "цинкові пальці" включає спіральну ділянку впізнання,
де
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 181, 182, 183, 184 і 185, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 35;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 186, 187, 188, 189, 190 і 191, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 36;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 182, 183, 184, 185, 194 і 195, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 37;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 182, 183, 185, 194 і 195, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 38;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 196, 197, 198, 199 і 200, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 39;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 201, 202, 186, 187, 188 і 189, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 40;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 184, 185, 194, 195, 203 і 204, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 41;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 201, 202, 196, 197 і 198, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 42;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 205, 206, 199, 207, 199 і 208, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 43;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі

порядку та показані в SEQ ID NO: 194, 209, 210, 211 і 212, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 44;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 213, 214, 182, 215 і 216, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 45;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 205, 217, 218, 219 і 220, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 46;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 221, 222, 199, 207 і 184, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 47;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 223, 224, 225 і 226, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 48;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 227, 228, 229, 230 і 231, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 49;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 223, 224, 225 і 226, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 50;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 184, 232, 233, 234 і 186, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 51;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 204, 223, 224, 225 або 226, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 52;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 204, 223, 192 і 235, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 53;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 184, 232, 233, 234 і 34, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 54;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 184, 33, 233, 32 і 223, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 55;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 31, 30, 192, 29, 233 і 28, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 56;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 227, 182, 236 і 237, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 263;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 184, 238, 182, 239 і 240, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 264;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 241, 242, 243, 233 і 244, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 265;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 184, 245, 182, 246, 227 і 247, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 266;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 227, 198, 237, 182, 218 і 248, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 267;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 219, 249, 210, 250, 237 і 224, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 268;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 237, 182, 218, 248 і 198, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 269;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі

порядку та показані в SEQ ID NO: 249, 73, 201, 216, 233 і 251, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 270;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 218, 248, 233, 184 і 198, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 271;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 237, 249, 252, 253 і 216, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 272;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 254, 255, 224, 256 і 205, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 273;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 252, 253, 203, 254, 237 і 224, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 274;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 255, 224, 256, 205, 249 і 257, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 275;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 224, 252, 253, 203 і 254, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 276;
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 258, 254, 221, 259, 260 і 261, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 277; або
нуклеаза "цинкові пальці" включає спіральні ділянки впізнання, розташовані у вказаному далі порядку та показані в SEQ ID NO: 216, 259, 218, 219 і 262, і розщеплює в або біля цільового сайта SEQ ID NO: 278.

9. Спосіб селекції рослинних клітин, що включають екзогенну послідовність, інтегровану в AHAS ген, де вказаний спосіб включає:

а) експресію однієї або більше сайт-специфічних нуклеаз за пунктом 8 у рослинній клітині, де одна або більше нуклеаз зв'язуються з послідовністю, яка включає цільовий сайт в AHAS гені, як показано в будь-якій з SEQ ID NO: 35-56 або 263-278, і розщеплюють ендогенні AHAS локуси;

б) інтеграцію однієї або більше екзогенних послідовностей в ендогенні AHAS локуси у межах геному рослинної клітини, таким чином, що ендогенний AHAS ген експресує продукт, який приводить до утворення здатного до селекції фенотипу в рослинній клітині; і

в) селекцію рослинних клітин, які експресують здатний до селекції фенотип, де вибирають такі рослинні клітині, що мають вбудовані одну або більше екзогенних послідовностей, де переважно одну або більше екзогенних послідовностей вибирають із групи, яка складається із донорного полінуклеотиду, трансгена або будь-якої їх комбінації, забезпечуючи таким чином селекцію рослинних клітин, що включають екзогенну послідовність, інтегровану в AHAS ген.

10. Спосіб за пунктом 9, де інтеграція однієї або більше екзогенних послідовностей здійснюється шляхом гомологічної рекомбінації або негомологічного сполучення кінців.

11. Спосіб за будь-яким з пунктів 9 або 10, де одна або більше екзогенних послідовностей вбудовуються одночасно або послідовно в ендогенні AHAS локуси.

12. Спосіб за будь-яким з пунктів 9-11, де AHAS ген

i) розміщений в A, B або D геномі поліплоїдного геному,

ii) одна або більше екзогенних послідовностей кодують S653N AHAS мутацію або P197S AHAS мутацію.

13. Спосіб за будь-яким з пунктів 9-12, де трансген кодує білок, який є вибраним із групи, що складається з білка, який збільшує вихід врожаю, білка, який кодує стійкість до захворювання, білка, який посилює ріст, білка, що кодує стійкість до комах, білка, який кодує толерантність до гербіцидів, та їх комбінації, і/або де інтеграція трансгена додатково включає введення однієї або більше інсерційно-делеційних мутацій, що порушують експресію одного або більше ендогенних локусів та забезпечують одержання здатного до селекції фенотипу.

14. Спосіб за будь-яким з пунктів 9-13, де спосіб додатково включає наступні етапи:

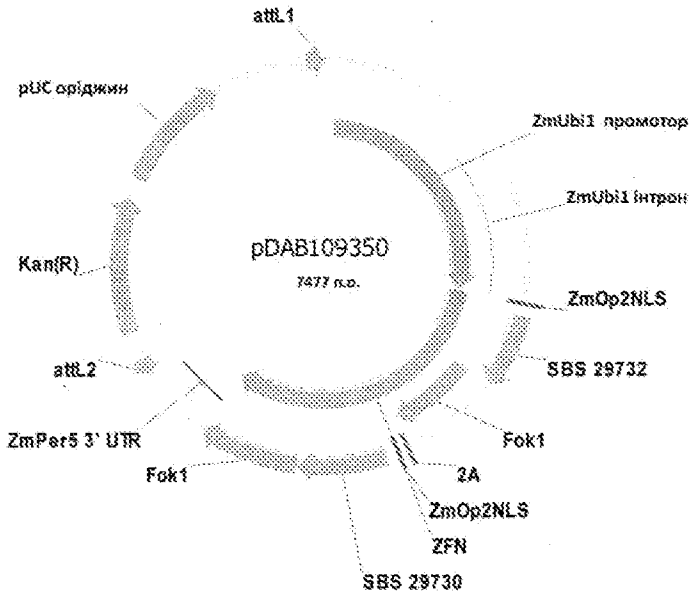
г) культивування відібраних рослинних клітин, що включають одну або більше екзогенних послідовностей; та

д) одержання цільної рослини, що включає одну або більше екзогенних послідовностей, інтегрованих в один або більше ендогенних локусів рослинного геному.

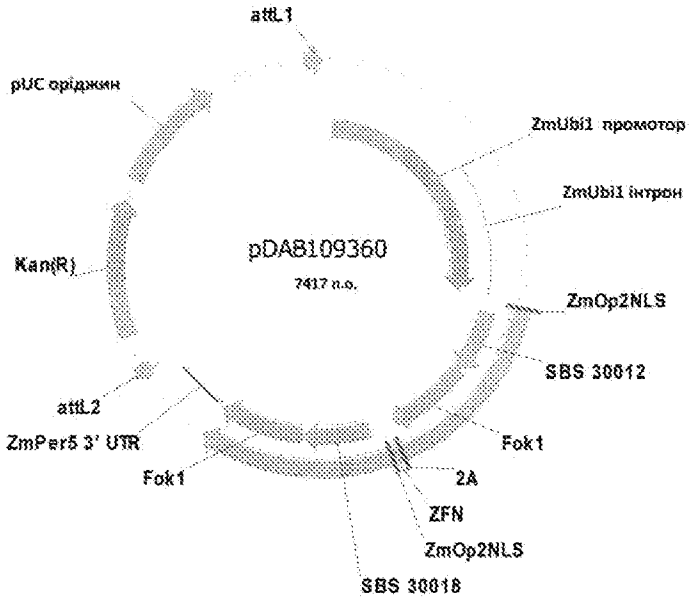
15. Спосіб за будь-яким з пунктів 9-14, де селективний агент, що включає імідазолінон, або селективний агент на основі сульфонілсечовини використовують для селекції рослинних клітин.

16. Спосіб за пунктом 14, де цільна рослина, що включає одну або більше екзогенних послідовностей, інтегрованих в один або більше ендогенних AHAS локусів рослинного геному, є додатково модифікованою для включення додаткової екзогенної послідовності у межах ендогенних локусів рослинного геному або де одна або більше екзогенних послідовностей не кодують трансгенний селектований маркер.

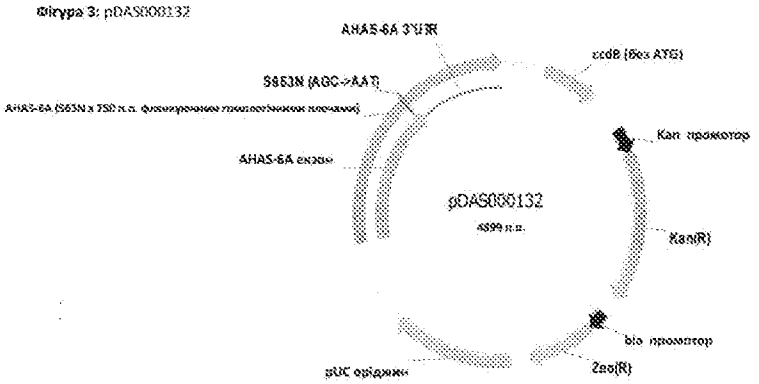
Фігура 1: pDAB109350



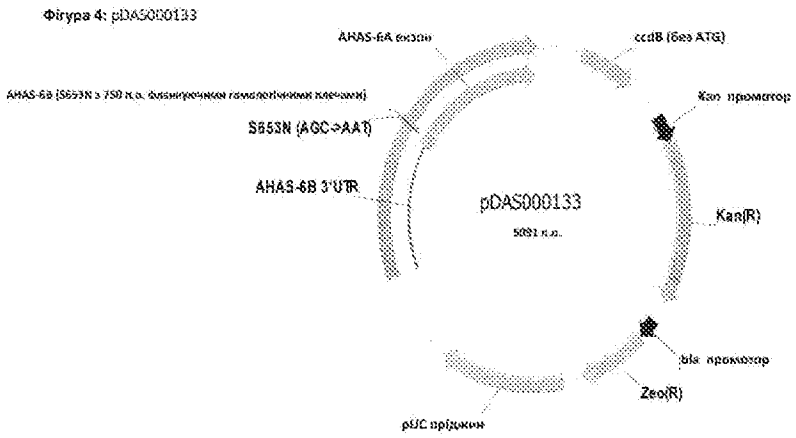
Фігура 2: pDAB109360



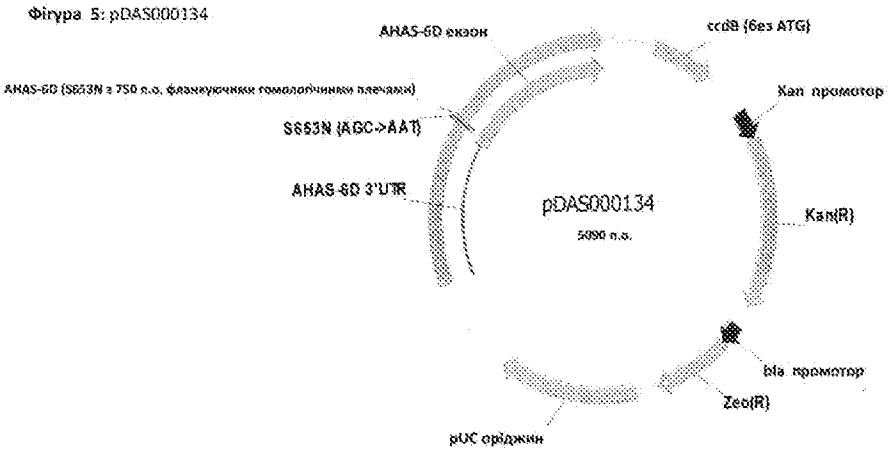
Фігура 3: pDAS000132



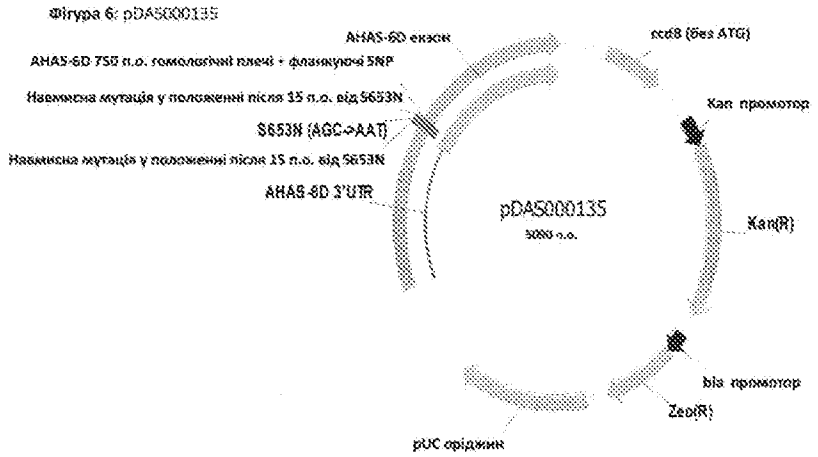
Фігура 4: pDAS000133



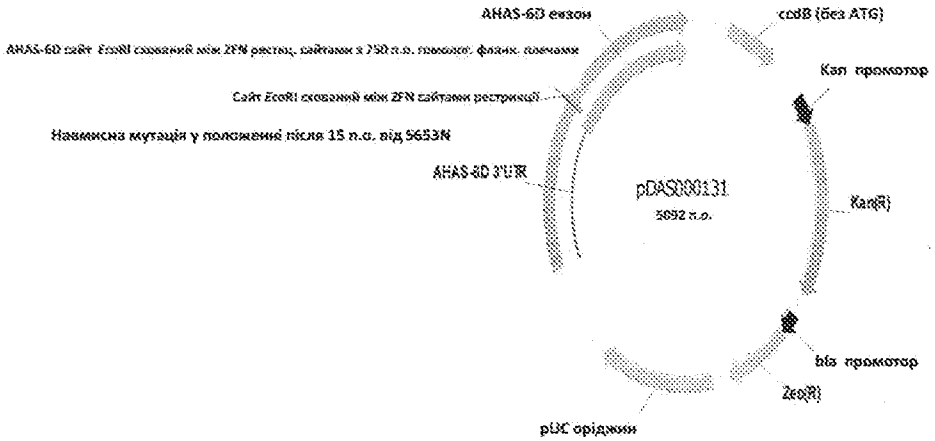
Фігура 5: pDAS000134



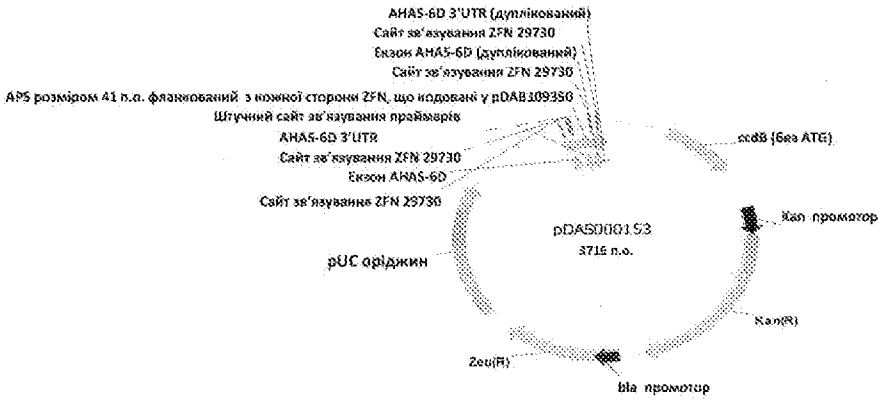
Фігура 6: pDAS000135



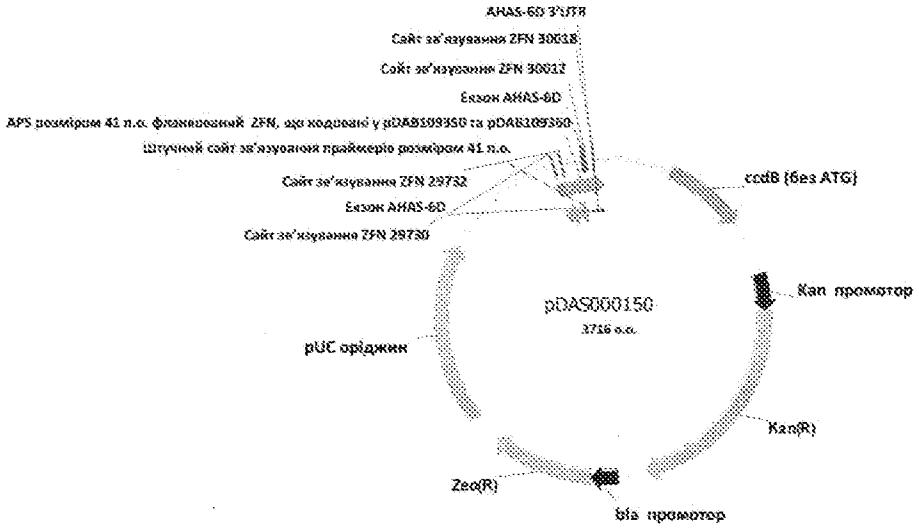
Фігура 7: pDAS000131



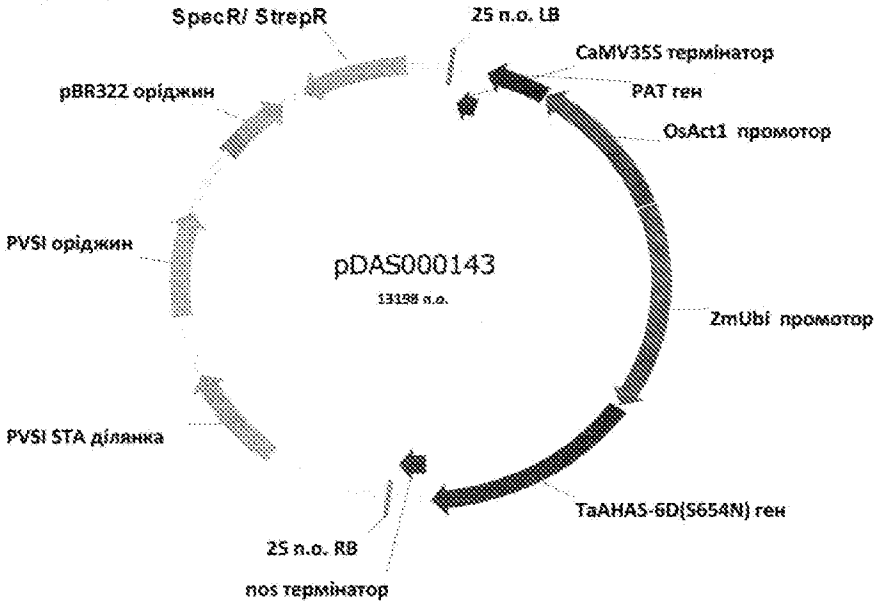
Фігура 8: pDAS000153



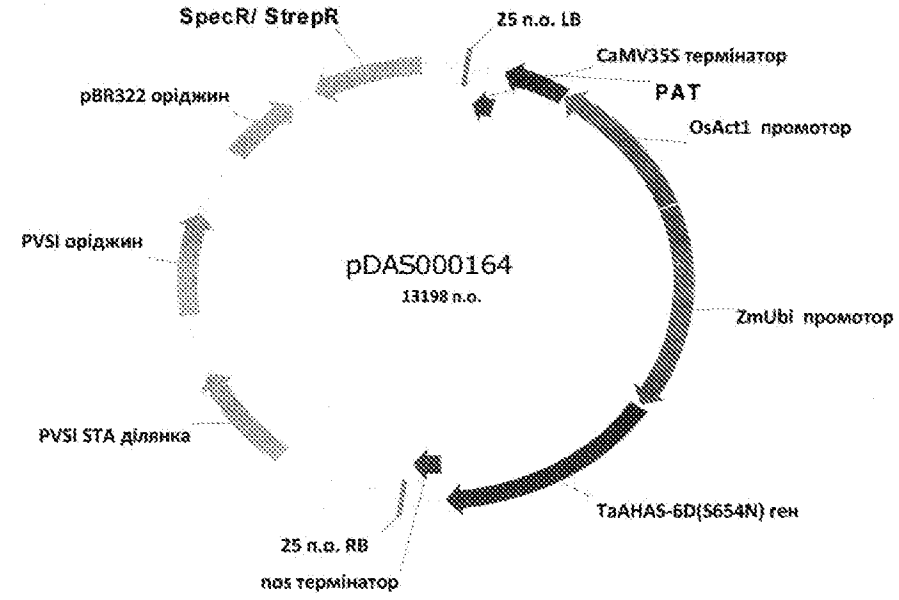
Фігура 9: pDAS000150



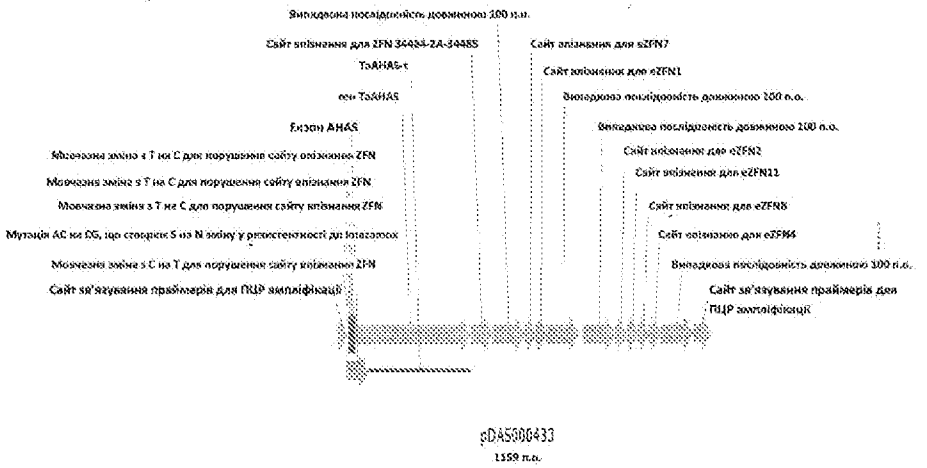
Фігура 10: pDAS000143



Фігура 11: pDAS000164

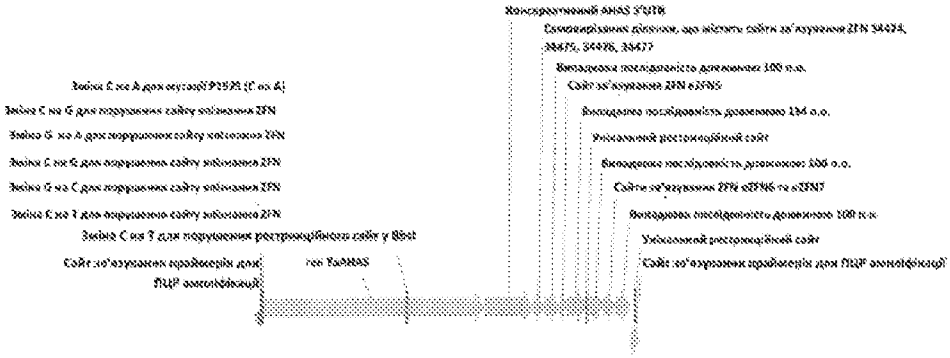


Фігура 12: pDAS000433



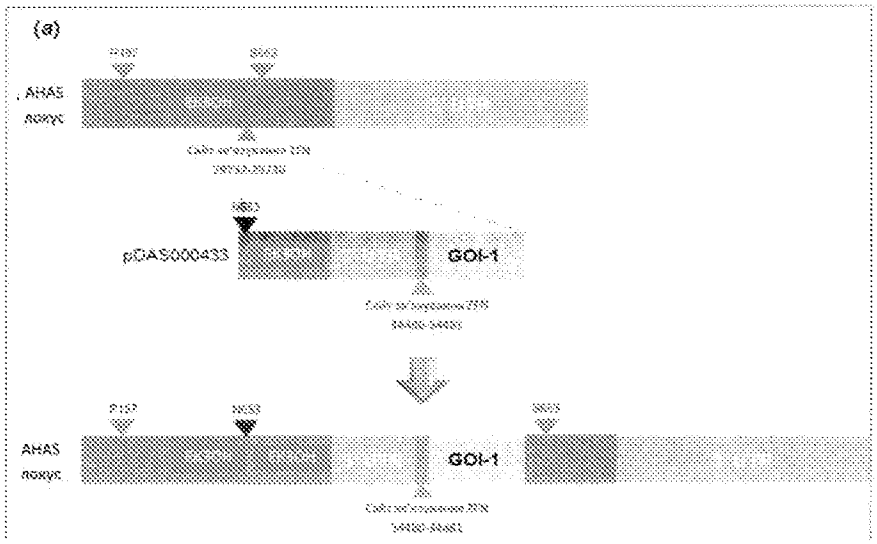
pDAS000433
1559 п.о.

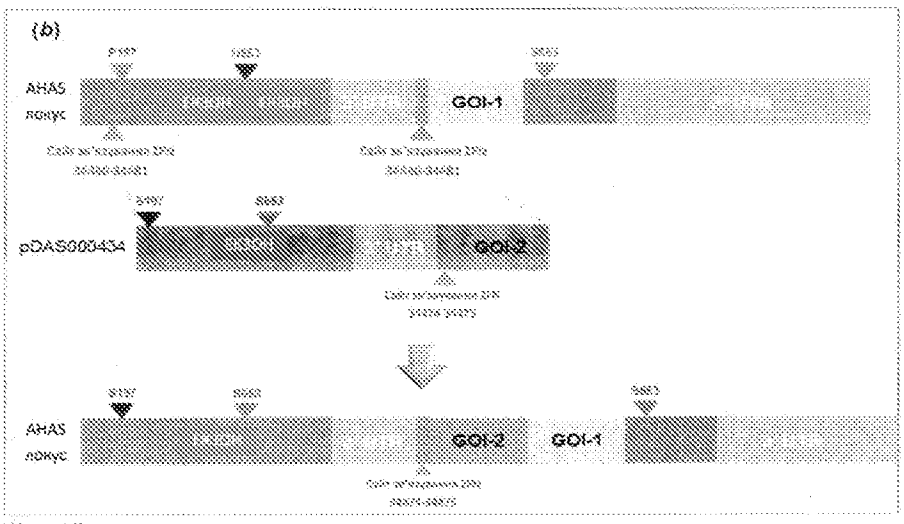
Фігура 13: pDAS000434



pDAS000434
2925 п.о.

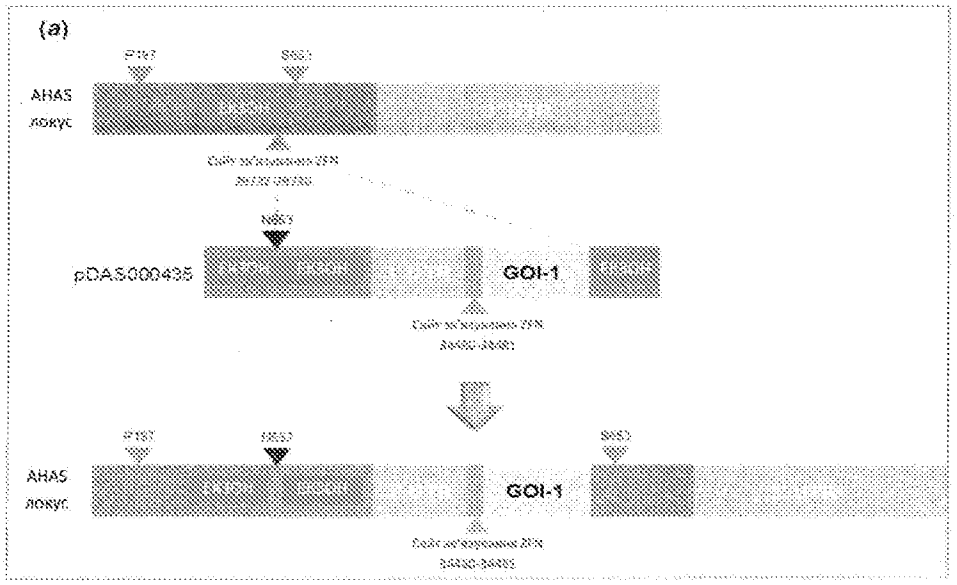
Фігура 14A

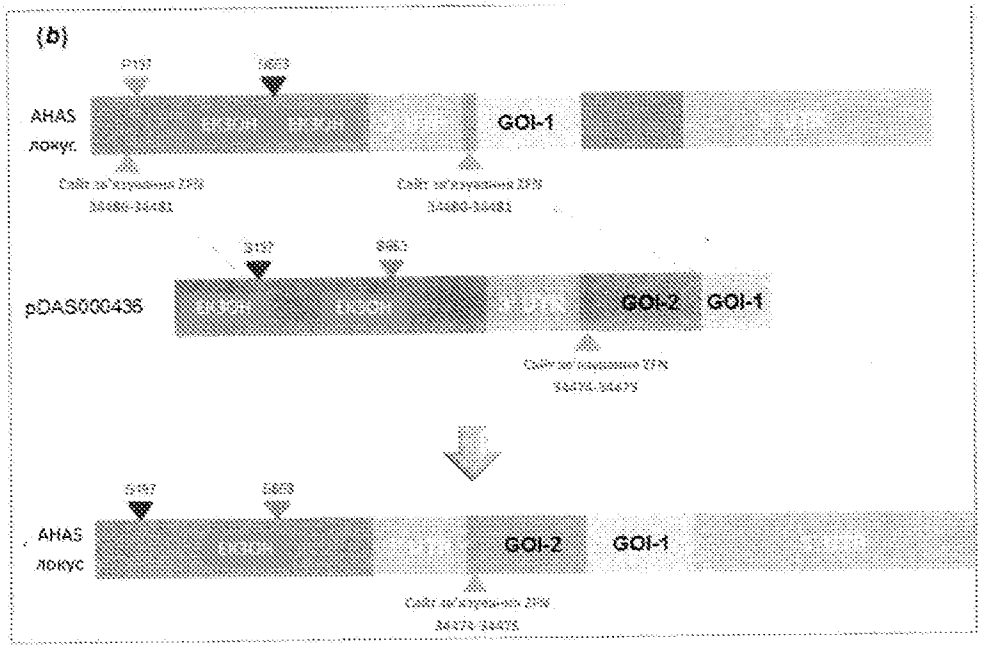




Фігура 14B

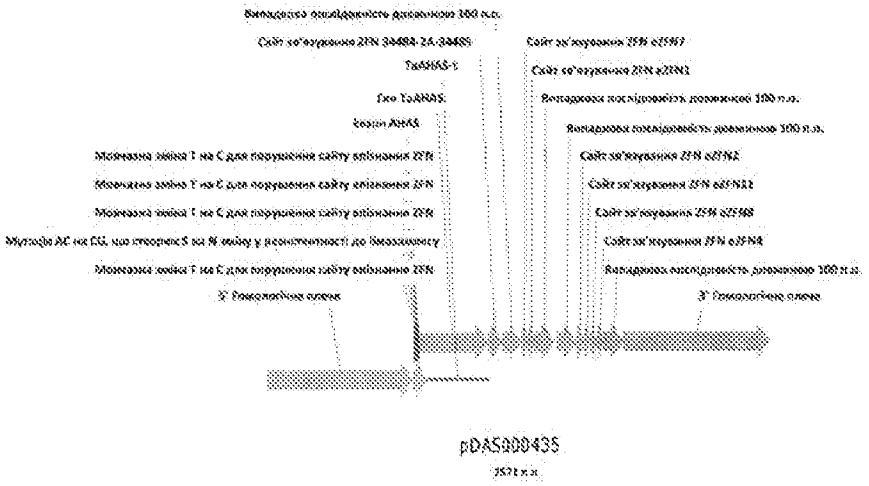
Фігура 15A



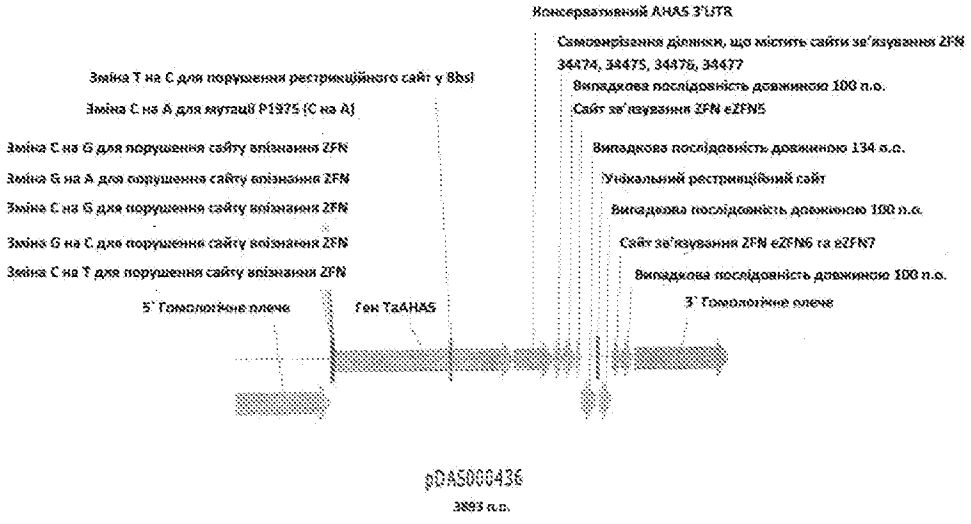


Фігура 15B

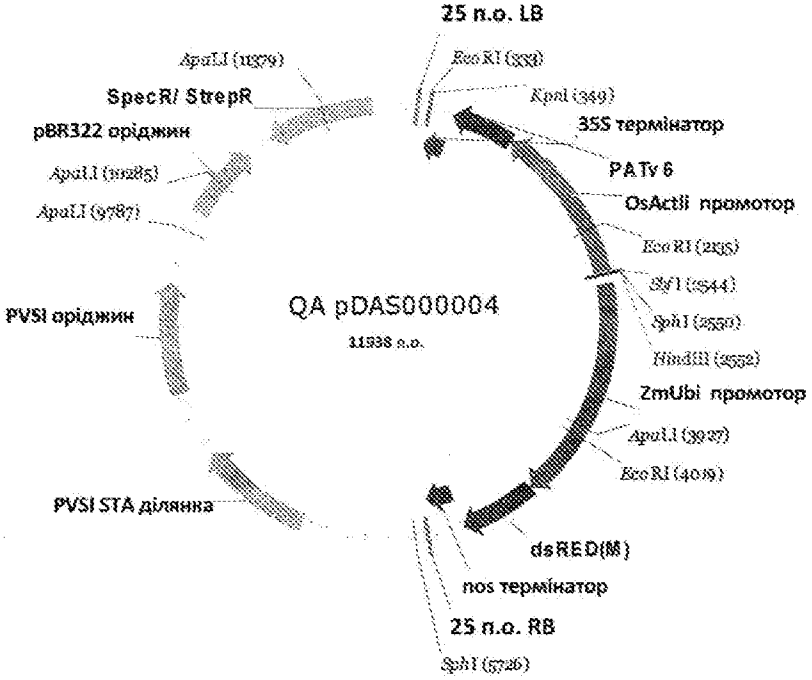
Фігура 16:



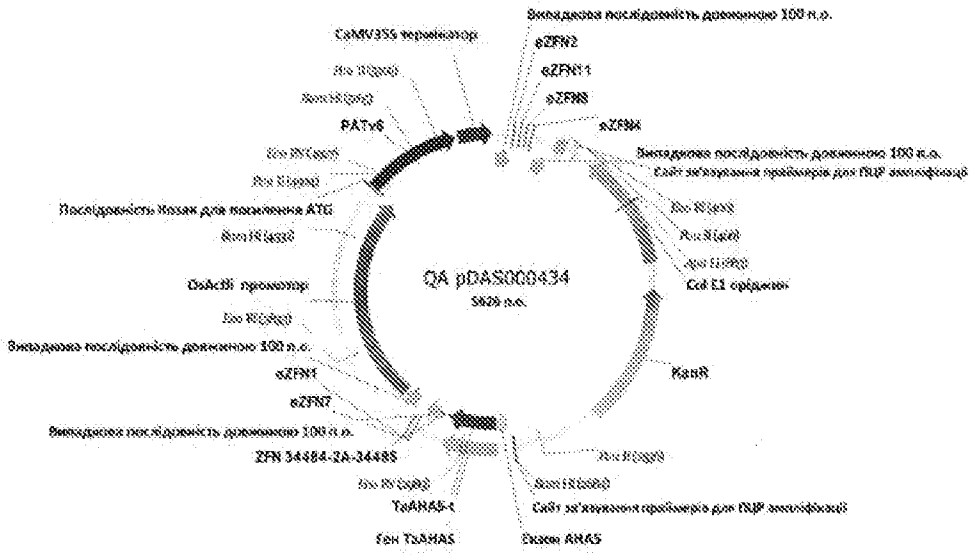
Фігура 17:



Фігура 18: pDAS000004



Фігура 19: "QA_pDAS000434"



Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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