بسم الله الرحمن الرحيم

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية KACST

المملكة العربية السعودية

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

إن المشرف العام على مكتب البراءات السعودي، وبموجب أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/٢٧ وتاريخ ١٤٢٥/٠٥/٢٩هـ، واستناداً لأحكام اللائحة التنفيذية له الصادرة بالقرار الإداري رقم ١١٨٨٢٨/م/١٠ وتاريخ ١٤٢٥/١١/١٤هـ، يقرر منح:

دو اجروسينسيس ال ال سى

Dow AgroSciences LLC

براءة اختراع رقم ٤٥١٦

بتاريخ ١٤٣٧/٠٢/١٣هـ الموافق ٢٠١٥/١١/٢٥ م

عن الاختراع المسمى/ طريقة وجزء منشأ لمعزز النبات SCBV التخليقي ثنائي الاتجاه

Method and construct for synthetic bidirectional SCBV plant promoter

ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق التي يمنحها النظام في المملكة العربية السعودية.

المشرف العام على مكتب البراءات السعودي

م. سامي بن علي السديس

[19] **المملكة العربية السعودية** SA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] **رقم البراءة:** ٤٥١٦
[45] **تاريخ المنح:** ١٤٣٧/٠٢/١٣ هـ
الموافـــق: ٢٠١٥/١١/٢٥ م

[12] براءة اختراع

[72] **اسم المخترع:** ساناديب كومار، ديا الابيد، سارة بينيت، مانجو جوبتا، سوزان جاين، تيرى ار ريت

[73] **مالك البراءة :** دو اجروسينسيس ال ال سى

عنوانه: ٩٣٣٠ زينسفيل رود، اندينابوليس، انديانا ٤٦٢٦٨ ـ ١٠٥٤ ، الولايات المتحدة الامريكية

جنسيته: امريكية

[74] **الوكيل:** شركة الهدف لخدمات العلامات المحدودة

[21] **رقم الطلب:** ١١٢٣٤٠١٦٣

[22] **تاريخ الإيداع :** ١٤٣٤/٠٢/١٧ هـ

الموافق : ٢٠١٢/١٢/٣٠ م

[30] **بيانات الأسبقية:**

US	٦١/٥٨٢.١٤٨	٢٠١١/١٢/٣٠م
US	٦١/٦٤١.٩٥٦	٢٠١٢/٠٣/٠٣م

[51] **التصنيف الدولي** (IPC[8]) :
A01H 05/00, C12N 15/11
C12N 15/63 C12N 15/82

[56] **المراجع:**

US ٠١٥٠٢٨٢	٢٠٠٦-	٢٠٠٦/٠٧/٠٦م
US ٠٠٣٣٦٧٧	٢٠٠٧-	٢٠٠٧/٠٢/٠٨م
US ٠٢٥٢٥٠٤	٢٠١١-	٢٠١١/١٠/١٣م

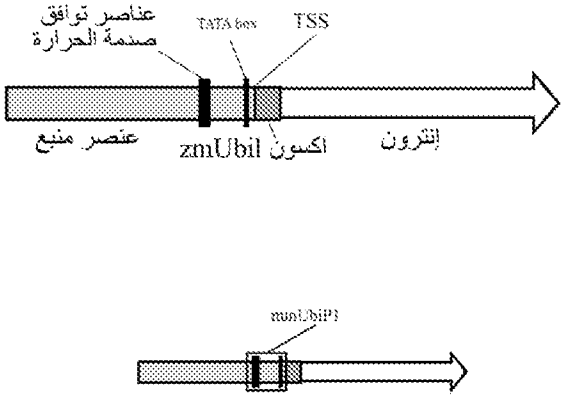
اسم الفاحص: حصه بنت عمر البيز

[54] **اسم الاختراع:** طريقة وجزء منشأ لمعزز النبات SCBV التخليقي ثنائي الاتجاه

Method and construct for synthetic bidirectional SCBV plant promoter

[57] **الملخص :** يتعلق الاختراع الحالي بتقديم أجزاء منشأ constructs وطرق للتعبير الجيني عن جينات متعددة multiple genes خلايا نبات و/أو أنسجة النبات. تشتمل أجزاء المنشأ المقدمة على معزز ثنائي الاتجاه bi directional promoter على الأقل متصل بمجموعات cassettes تعبير جيني عن الجين متعددة، حيث يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على تتابع نيوكليوتيد معزز وظيفي functional promoter nucleotide sequence من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر Sugar Cane Bacilliform Virus promoter. في بعض التجسيمات، تستخدم أجزاء المنشأ والطرق المقدمة معزز ثنائي الاتجاه يعتمد على أدنى عنصر معزز أساسي minimal core promoter element من جين Zea mays Ubiquitin-1، أو مكافئ وظيفي منه، وعناصر تتابع نيوكليوتيد من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر. في بعض التجسيمات، تسمح أجزاء المنشأ وطرق المقدمة بالتعبير الجيني عن جينات بين ثلاثة وعشرون.

عدد عناصر الحماية (٤٨)، عدد الأشكال (٥٦)



الشكل (١)

طريقة وجزء منشأ لمعزز النبات SCBV التخليقي ثنائي الاتجاه

Method and construct for synthetic bidirectional SCBV plant promoter

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع الحالي بمجال النباتات الحيوي الجزيئي plant molecular biology ، وبخاصة أكثر مجال التعبير الثابت للجينات المتعددة multiple genes في النباتات المتحورة وراثياً transgenic plants. تُعد كثير من أنواع النباتات plant species قادرة على أن تتحول بالجينات المتحورة transgenes وراثياً من أنواع أخرى لتدخل صفات مرغوبة محصولياً أو خصائص، على سبيل المثال، تحسين نوعية quality القيمة الغذائية nutritional value، أو زيادة الناتج increasing yield، أو نقل الآفات conferring pest، أو مقاومة الأمراض disease resistance، أو زيادة الجفاف increasing drought والسماحية للضغط stress tolerance، أو تحسين الصفات البستانية horticultural qualities (مثل الصبغ pigmentation والنمو growth)، أو إضفاء القدرة على مقاومة مبيدات الأعشاب herbicide resistance، أو أن تكون لها القدرة على إنتاج مركبات compounds مفيدة صناعياً و/أو مواد materials من النبات و/أو أن تكون لها القدرة على إنتاج المركبات الصيدلية pharmaceuticals. يمكن لإدخال الجينات المتحورة وراثياً إلى خلايا النبات plant cells والاستخلاص التالي للنباتات المخصبة بالجينات المتحورة وراثياً fertile transgenic plants التي تحتوي على نسخة متكاملة integrated copy بشكل ثابت للجين المتحور وراثياً أن تستخدم في إنتاج نباتات متحورة وراثياً transgenic plants والتي تمتلك الصفات المرغوبة.

قد يحدث التحكم Control والتنظيم regulation لتعبير الجين من خلال آليات mechanisms متعددة. ويُعد بدء initiation النسخ Transcription للجين gene طريقة تحكم سائدة لتعبير الجين gene expression. ويتم التحكم عامة في بدء النسخ بواسطة تتابعات sequences عديد النيوكليوتيد polynucleotide الواقعة في الـ 5′- الجانبي flanking 5′- أو المنطقة القبلية

upstream region للجين المراد نسخه transcribed gene. وتشير هذه التتابعات مجتمعة إلى كونها كمحفزات promoters. وتحتوي المحفزات عامة على إشارات signals لـRNA.

بوليميراز polymerase لبدء النسخ ولذلك قد يتكون الـRNA الناقل messenger (mRNA) ويتم ترجمة الـmRNA الناضج Mature بواسطة الريبوسوم ribosome، وبالتالي توليفات البروتينات proteins. وتتفاعل البروتينات المرتبطة بـDNA بشكل خاص مع تتابعات الـDNA المحفزة promoter لتعزز تكوين معقد النسخ transcriptional complex وتقوم ببدء عملية التعبير الجيني gene expression process. وهناك محفزات مختلفة حقيقية النواة منفصلة eukaryotic promoters isolated ومتصفة عن النباتات التي تُعد وظيفية لتدفع بالتعبير الجيني للجينات المتحورة وراثياً في النباتات. ويتم فصل ووصف المحفزات التي تؤثر على تعبير الجين كرد فعل على المؤثرات البيئية environmental stimuli، أو إتاحة المواد الغذائية nutrient availability، أو الظروف المضادة adverse conditions والتي تشمل الصدمة الحرارية heat shock، أو اللاهوائية anaerobiosis، أو وجود معادن ثقيلة heavy metals. وهناك أيضاً المحفزات التي تتحكم في تعبير الجين أثناء التطور development أو في نسيج tissue أو عضو organ معين. بالإضافة إلى أنه يتم فصل ووصف محفزات بدائيات النواة المعزولة prokaryotic promoters isolated من البكتيريا bacteria والفيروسات virus التي تُعد وظيفية للدفع بتعبير الجين المتحور وراثياً في النباتات.

ويتكون محفز حقيقيات النواة النموذجي typical eukaryotic promoter من محفز promoter أدنى وعناصر سيس cis-elements. ويُعد المحفز الأدنى هو في الأساس منطقة صندوق box TATA region حيث ربما ترتبط RNA بوليميراز polymerase II II (polII)، وبروتين الارتباط بـTATA (TBP)، والعوامل المرتبطة بـTBP (TAFs) لبدء النسخ. بالرغم من أنه في معظم الأمثلة يتطلب عناصر تتابع غير باعث TATA motif للنسخ المضبوط. وقد وجد مثل هذا التتبع من العناصر elements (مثل، المعززات enhancers) للتخلص من مستوى التعبير الكلي للجينات المجاورة nearby genes، غالباً في طريقة manner موضع position و/أو توجه مستقل orientation-independent. وربما تمد التتابعات الأخرى والتي بالقرب من مكان بدء النسخ (مثل، تتابعات INR) لبعض جينات الـpolII بمكان ارتباط بديل للعوامل التي تساهم

أيضاً في النشاط النسخي transcriptional activation، حتى أنها تمد بديلاً عن ذلك بأماكن ارتباط binding المحفز الأساسيcore promoter للنسخ في المحفزات التي تفتقد عناصر TATA الوظيفية. انظر مثلاً، Zenzie-Gregory et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 2823-30.

تشمل عناصر تنظيمية للجين gene regulatory elements أخرى على تتابعات تتفاعل مع عوامل ارتباط الDNA الخاصة. ويتم الإشارة للبواعث motifs التتابع تلك بعناصر سيس، وغالباً موضع وتوجه مستقل، بالرغم من أنه ربما يتم إيجاد 5′ أو 3′ إلى تتابع تشفير coding لهذا الجين، أو في إنترون intron. وربما تحدد مثل عناصر سيس، والتي يرتبط بها عوامل نسخ transcription factors خاصة بالنسيج أو خاصة بالتطوير، بصفة فردية أو في مجموعة، نمط التعبير الجيني الزماني المكاني spatiotemporal expression pattern للمحفز عند المستوى النسخي transcriptional level. وبشكل نموذجي يؤسس ترتيب عناصر سيس عكس الاتجاه upstream والتالي لها من المحفز الأدنى القطبية polarity لمحفز خاص. وتُعد المحفزات في النباتات التي تم وضعها في مستعمرات cloned والمستخدمة بشكل واسع لكل من البحث الأساسي والتطبيق البيوتكنولوجي biotechnological application بصفة عامة أحادية الاتجاه، موجهة فقط جين واحد الذي يتم دمجه عند نهايته 3′ (أي، مع الاتجاه downstream). انظر على سبيل المثال Xie et al. (2001) Nat. Biotechnol. 19(7):677-9؛ براءة الاختراع الأميركية ٦,٣٨٨,١٧٠.

وقد تم التعرف على العديد من عناصر سيس (أو "تتابعات تنظيمية عكس الاتجاه upstream regulatory sequences") في محفزات النبات. وتختلف بشكل واسع عناصر سيس تلك في طريقة التحكم التي تنفذها على الجينات المرتبطة بإجراء العملية. وبعض العناصر تعمل على زيادة النسخ للجينات المرتبطة بإجراء العملية كرد فعل للاستجابات البيئية environmental responses (مثل، درجة الحرارة temperature، والرطوبة moisture، والإصابة wounding). وربما تستجيب عناصر سيس إلى العظة التطورية developmental cues (مثل، التجرثم germination، ونضوج البذور seed maturation، والتزهر flowering) أو إلى معلومة مكانية spatial information (مثل، خصوصية النسيج tissue specificity). انظر

على سبيل المثال، Langridge et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3219-23. ويُعد نوع التحكم لعناصر المحفز الخاص ذا نوعية داخلية للمحفز بشكل نموذجي؛ أي يتم التعبير على الأرجح عن جين غير متجانس heterologous gene تحت التحكم لمثل هذا المحفز وفقاً للتحكم للجينات الأصلية native gene والتي منها تم عزل عنصر المحفز. وربما يتم التبديل لتلك العناصر أيضاً بعناصر أخرى والحفاظ على قدرتهم بالتحكم الداخلي intrinsic control في التعبير الجيني.

إنه من الضروري غالباً إدخال جينات متعددة في النباتات من أجل الهندسة الآيضية metabolic engineering ورص الصفات trait stacking، التي يتم التحكم فيها مراراً بمحفزات متطابقة أو متجانسة. بالرغم من أنه على الأرجح لإسكات الجين على أساس التجانس homology-based gene silencing (HBGS) أن تنشأ عندما تمتلك الجينات المتحورة وراثياً والتي تم إدخالها محفزات متجانسة homologous promoters تقوم بدفعهم. انظر على سبيل المثال Mol et al. (1989) Plant Mol. Biol. 13:287-94. وقد تم تسجيل HBGS تحدث بشكل كبير في النباتات المتحورة وراثياً. انظر على سبيل المثال Vaucheret and Fagard (2001) Trends Genet. 17:29-35. وقد تم اقتراح العديد من الآليات لشرح ظاهرة الـHBGS، ويشمل كل منها على الخاصية التي تحفز آليات mechanisms تعرف خلوي cellular recognition التي تؤدي إلى إسكات silencing الجينات المتكررة repeated genes لتتابع متجانس في المحفز. انظر على سبيل المثال Matzke and Matzke (1995) Plant Physiol. 107:679-85; Meyer and Saedler (1996) Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47:23-48; Fire (1999) Trends Genet. 15:358-63; Hamilton and Baulcombe (1999) Science 286:950-2; and Steimer et al. (2000) Plant Cell 12:1165-78.

وتشمل استراتيجيات تجنب الـ HBGS في النباتات المتحورة وراثياً مراراً على تطور المحفزات المخلقة synthetic promoters التي تُعد مكافئة وظيفياً ولكن تمتلك التجانس الأدنى للتتابع. وعندما تستخدم مثل تلك المحفزات المخلقة لتعبر عن الجينات المتحورة في نباتات المحصول crop plants، فربما تساعد في تجنب أو تقليل HBGS. انظر على سبيل المثال Mourrain et

al. (2007) Planta 225(2):365-79; Bhullar et al. (2003) Plant Physiol. 132:988-98. ويمكن لهذه المحفزات ان تتولد بإدخال عناصر سيس المعروفة في امتداد الDNA الجديد أو المُخلق، أو بديلاً عن ذلك بواسطة "مجال مبادلة domain swapping"، حيث يتم استبدال مجالات المحفز الواحد بمجالات مكافئة وظيفياً من المحفزات الغير متجانسة heterologous promoters الأخرى.

بالتالي، يبقى هناك حاجة لأجزاء منشأ وطرق للتعبير الجيني المستقر عن تمحورات وراثية متعددة بأدنى خطورة بشكل فعّال لناتج عودة الارتباط الجيني أو فقط تمحور وراثي من خلال التولّد breeding أو الأجيال المتعددة في نباتات معدلة وراثياً.

الوصف العام للاختراع

يتم في هذه الوثيقة وصف معززات تخليقية خاصة تتضمن أدنى معزز Ubi1. في التجسيمات، معزز تخليقي synthetic promoter يتضمن أدنى معزز Ubi1 يتضمن أيضاً على الأقل عنصر تتابع واحد من معزز SCBV أو مكافئ وظيفي منه. في بعض الأمثلة، قد يكون ذلك المعزز التخليقي ("معزز SCBV تخليقي") عبارة عن معزز يكون قادر على التحكم بنسخ تتابع نيوكليوتيد nucleotide sequence متصل بشكل عملي في خلية نبات plant cell. في الأمثلة الأخرى، قد يكون معزز SCBV تخليقي عبارة عن معزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي synthetic bidirectional، على سبيل المثال، حمض نووي nucleic acid يتضمن تتابعات نيوكليوتيد nucleotide sequences أدنى عنصر معزز Ubi1 موجهة في الاتجاه المقابل بالنسبة لعناصر معزز SCBV تكون قادرة على التحكم بنسخ في خلية نبات تتابعى نيوكليوتيد متصل بشكل عملى تحيط بالمعزز. تشتمل العناصر الإضافية التي يمكن تعديلها وراثياً التي تكون متضمنة في معزز ثنائي الاتجاه SCBV تخليقي على إنترونات introns (على سبيل المثال، إنترونات كحول نازع للهيدروجين alcohol dehydrogenase (ADH))، إكسونات exons، و/أو كل أو جزء من منطقة جين عكس الاتجاه. في أمثلة معينة، قد يشتمل معزز ثنائي الاتجاه تخليقي synthetic bidirectional promoter على أكثر من واحد من أي مما سبق.

تشتمل تجسيمات خاصة من الاختراع على خلايا cells (على سبيل المثال، خلايا نبات) تتضمن معزز SCBV تخليقي أو مكافئ وظيفي منه. على سبيل المثال، قد تشتمل التجسيمات الخاصة على خلية تتضمن معزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي أو مكافئ وظيفي منه. قد توجد خلايا نبات وفقاً لتجسيمات خاصة في مستنبت خلية cell culture، نسيج، جزء نبات plant part، و/أو كامل النبات whole plant. بالتالي، يتم تضمين نباتات (على سبيل المثال، أحادية الفلقة monocot أو ثنائية الفلقة dicot) تتضمن خلية بها معزز SCBV تخليقي أو مكافئ وظيفي functional equivalent منه في بعض التجسيمات.

تشتمل تجسيمات أخرى من الاختراع على وسائل لبداية نسخ تتابعى نيوكليوتيد متصل بشكل عملى محل الاهتمام. تشتمل وسائل بداية نسخ تتابعى نيوكليوتيد متصلين بشكل عملي محل الاهتمام على معزز SCBV ثنائي الاتجاه التخليقي لهوية تتابع رقم: ٥.

يتم أيضاً تقديم أجزاء منشأ وطرق للتعبير الجيني عن جينات متعددة خلايا نبات و/أو أنسجة النبات plant tissues. تشتمل أجزاء المنشأ constructs المقدمة على معزز ثنائي الاتجاه bi-directional promoter على الأقل متصل بمجموعات تعبير جيني عن الجين متعددة، حيث يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على تتابع نيوكليوتيد معزز وظيفي من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر Sugar Cane Bacilliform Virus (SCBV). في بعض التجسيمات، تستخدم أجزاء المنشأ والطرق المقدمة معزز ثنائي الاتجاه يعتمد على أدنى عنصر معزز أساسي من جين Zea mays Ubiquitin-1، أو مكافئ وظيفي منه، وعناصر تتابع نيوكليوتيد من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر. في بعض التجسيمات، تسمح أجزاء المنشأ وطرق المقدمة بالتعبير الجيني عن جينات بين ثلاثة وعشرون.

في أحد السمات، يتم تقديم عديد نيوكليوتيد تخليقي يتضمن أدنى عنصر معزز أساسي من جين Ubiquitin-1 من Zea mays أو Zea luxurians وتتابع نيوكليوتيد معزز وظيفي من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر. في أحد التجسيمات، يشتمل أدنى عنصر معزز أساسي على تتابع عديد النيوكليوتيد حيث تكون على الأقل ٦٥٪، ٧٠٪، ٧٥٪، ٨٠٪، ٨٥٪، ٩٠٪، ٩٥٪، أو ١٠٠٪ مطابقة لهوية تتابع رقم: ١ أو تكملته. في تجسيم إضافي أو بديل، يشتمل أدنى عنصر معزز أساسي على تتابع عديد النيوكليوتيد منتقى من المجموعة التي تشتمل على هوية

تتابع أرقام: ١ و١٦-٤٠. في تجسيم إضافي، يشتمل أدنى عنصر معزز أساسي على هوية تتابع رقم: ١ أو تكملته. في تجسيم إضافي، يتكون أدنى عنصر معزز أساسي بشكل أساسي من هوية تتابع رقم: ١ أو تكملته. في تجسيم آخر، يشتمل عديد النيوكليوتيد التخليقي مقدم أيضاً على إكسون exon من جين Ubiquitin-1 وإنترون من جين Ubiquitin-1. في تجسيم إضافي، يكون الإكسون من جين Ubiquitin-1 من Zea mays أو Zea luxurians. في تجسيم آخر، يشتمل عديد النيوكليوتيد التخليقي مقدم أيضاً على إنترون من جين كحول نازع للهيدروجين alcohol dehydrogenase gene. في تجسيم آخر، يشتمل عديد النيوكليوتيد التخليقي مقدم أيضاً على تتابع تنظيمي عكس الاتجاه من معزز الفيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر. في تجسيم آخر، تتابع نيوكليوتيد المعزز الوظيفي من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر وجين الكحول النازع للهيدروجين تتابع عديد النيوكليوتيد حيث تكون على الأقل ٦٥٪، ٧٠٪، ٧٥٪، ٨٠٪، ٨٥٪، ٩٠٪، ٩٥٪، أو ١٠٠٪ مطابقة لهوية تتابع رقم: ٦ أو تكملته. في تجسيم إضافي أو بديل، تشتمل تتابع نيوكليوتيد المعزز الوظيفي من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر وجين الكحول النازع للهيدروجين على هوية تتابع رقم: ٦ تكملته. في تجسيم إضافي، يتكون تتابع نيوكليوتيد المعزز الوظيفي من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر وجين الكحول النازع للهيدروجين بشكل أساسي من هوية تتابع رقم: ٦ أو تكملته.

في أحد التجسيمات، يشتمل عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide مقدم أيضاً على عنصر واحد على الأقل منتقى من قائمة تتضمن تتابع تنظيمي عكس الاتجاه upstream regulatory sequence (URS)، عنصر محسّن enhancer element، إكسون، إنترون، موقع بداية نسخ transcription start site، صندوق TATA، عنصر إجماعي للصدمة الحرارية heat shock consensus element، وتتابع نيوكليوتيد لبدء START و/أو توقف STOP الترجمة. في تجسيم آخر، يشتمل عديد النيوكليوتيد التخليقي مقدم أيضاً على عنصر منتقى من المجموعة التي تشتمل على تتابع تنظيمي عكس الاتجاه (URS)، عنصر محسّن، إكسون، إنترون، موقع بداية نسخ، صندوق TATA، عنصر إجماعي للصدمة الحرارية، تتابع نيوكليوتيد لبدء START و/أو توقف STOP الترجمة، وتوليفات منها. في تجسيم آخر، يشتمل عديد النيوكليوتيد التخليقي مقدم أيضاً على تتابع نيوكليوتيد محل الاهتمام متصل بشكل عملي بأدنى

عنصر معزز أساسي minimal core promoter element. في تجسيم آخر، يكون أدنى عنصر معزز أساسي من جين Zea mays Ubiquitin-1 وتتابع نيوكليوتيد المعزز الوظيفي من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر في اتجاه تكميلي عكسي reverse complimentary orientation بالنسبة لبعضها البعض في عديد النيوكليوتيد.

في تجسيم آخر، يشتمل عديد النيوكليوتيد التخليقي المتوفر على إكسون من جين Ubiquitin-1، إنترون من جين Ubiquitin-1، وإنترون من جين كحول نازع للهيدروجين. في تجسيم إضافي أو بديل، يشتمل عديد النيوكليوتيد التخليقي المتوفر على تتابع نيوكليوتيد مشفر ثانية محل الاهتمام متصل بشكل عملي بتتابع نيوكليوتيد المعزز الوظيفي من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر. في تجسيم إضافي، يشتمل عديد النيوكليوتيد التخليقي المتوفر على تتابع عديد النيوكليوتيد حيث يكون على الأقل ٦٥٪، ٧٠٪، ٧٥٪، ٨٠٪، ٨٥٪، ٩٠٪، ٩٥٪، أو ١٠٠٪ مطابق لهوية تتابع رقم: ٥ أو تكملته. في تجسيم إضافي، يشتمل عديد النيوكليوتيد التخليقي المتوفر على هوية تتابع رقم: ٥ أو تكملته. في تجسيم إضافي، يتكون عديد النيوكليوتيد التخليقي المتوفر بشكل أساسي من هوية تتابع رقم: ٥ أو تكملته. في تجسيم إضافي، يكون الإكسون أو الإنترون من جين Ubiquitin-1 من Zea mays أو Zea luxurians.

في تجسيم إضافي، يشتمل عديد النيوكليوتيد التخليقي المتوفر على تتابع نيوكليوتيد مشفر أولى محل الاهتمام متصل بشكل عملى بأدنى عنصر معزز أساسي من جين Zea mays Ubiquitin-1. في تجسيم آخر إضافي، يشتمل عديد النيوكليوتيد التخليقي المتوفر على تتابع نيوكليوتيد مشفر ثانية محل الاهتمام متصل بشكل عملى بتتابع نيوكليوتيد المعزز الوظيفي من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر.

في أحد السمات، يتم تقديم طريقة method لإنتاج خلية معدلة وراثياً، تشتمل الطريقة على التعديل الوراثي للخلية باستخدام عديد النيوكليوتيد مقدم في هذه الوثيقة. في أحد التجسيمات، تكون الخلية عبارة عن خلية نبات. في سمة أخرى، يتم تقديم خلية نبات يتضمن عديد النيوكليوتيد مقدم في هذه الوثيقة. في سمة أخرى، يتم تقديم نبات يتضمن خلية النبات المتوفرة في هذه الوثيقة.

في أحد السمات، يتم تقديم طريقة للتعبير الجيني عن تتابع نيوكليوتيد محل الاهتمام في خلية نبات، تشتمل الطريقة على إدخال في خلية النبات تتابع النيوكليوتيد محل الاهتمام متصل بشكل عملى بوسائل لبداية نسخ تتابعى نيوكليوتيد متصل بشكل عملى محل الاهتمام. في أحد التجسيمات، تشتمل الطريقة المقدمة على إدخال في خلية النبات حمض نووي يتضمن (أ) تتابع النيوكليوتيد محل الاهتمام متصل بشكل عملى بالوسائل لبداية نسخ تتابعى نيوكليوتيد متصل بشكل عملى محل الاهتمام؛ و(ب) تتابع نيوكليوتيد ثانى محل الاهتمام متصل بشكل عملى بالوسائل لبداية نسخ تتابعى نيوكليوتيد متصل بشكل عملى محل الاهتمام.

في أحد التجسيمات، تشتمل الوسائل means لبداية نسخ تتابعى نيوكليوتيد متصل بشكل عملى محل الاهتمام على هوية تتابع رقم: ٥ أو تكملته. في تجسيم آخر، تشتمل الوسائل لبداية نسخ تتابعى نيوكليوتيد متصل بشكل عملى محل الاهتمام على هوية تتابع رقم: ٥. في تجسيم آخر، تشتمل الوسائل لبداية نسخ تتابعى نيوكليوتيد متصل بشكل عملى محل الاهتمام على التكامل العكسي لهوية تتابع رقم: ٥. في تجسيم آخر، يتم إدخال الحمض النووي في خلية النبات حتى تستهدف موقع سابق التحديد في DNA بخلية النبات تتابع النيوكليوتيد محل الاهتمام متصل بشكل عملى بالوسائل لبداية نسخ تتابعى نيوكليوتيد متصل بشكل عملى محل الاهتمام. في تجسيم إضافي أو بديل، يستهدف تتابع النيوكليوتيد محل الاهتمام متصل بشكل عملى بالوسائل لبداية نسخ تتابعى نيوكليوتيد متصل بشكل عملى محل الاهتمام الموقع سابق التحديد باستخدام ناتج عودة ارتباط جيني ناتج mediated recombination عن نيوكلياز إصبع زنك Zinc finger nuclease.

في بعض التجسيمات، يكون الإكسون من جين Ubiquitin-1 من Zea spp. في بعض التجسيمات، يكون الإنترون من جين Ubiquitin-1 من Zea spp. في بعض التجسيمات، يكون نوع Zea هو Zea mays أو Zea luxurians.

في أحد السمات، يتم تقديم جزء منشأ حمض نووي nucleic acid construct للتعبير الجيني عن جينات متعددة خلايا و/أو أنسجة نبات. يشتمل جزء منشأ الحمض النووي على (أ) معزز ثنائي الاتجاه، حيث يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على تتابع نيوكليوتيد معزز وظيفي من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر (SCBV)؛ و(ب) مجموعتين تعبير جيني عن الجين

على النهايات المتقابلة للمعزز ثنائي الاتجاه؛ حيث تشتمل واحدة على الأقل من مجموعات التعبير الجيني عن الجين على اثنين أو أكثر من الجينات متصلة عن طريق محول ترجمة translation switch.

في أحد التجسيمات، يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على معزز واحد على الأقل. في تجسيم آخر، لا يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على معزز enhancer. في تجسيم آخر، يشتمل جزء منشأ الحمض النووي على ناقل ثنائي binary vector للتحول الوراثي الناتج عن الأجرعية Agrobacterium-mediated transformation. في أحد التجسيمات، يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على عنصر منتقى من المجموعة التي تشتمل على تتابع تنظيمى عكس الاتجاه (URS)، عنصر محسّن، إكسون، إنترون، موقع بداية نسخ، صندوق TATA، عنصر إجماعى للصدمة الحرارية، وتوليفات منها. في تجسيم آخر، يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على أدنى عنصر معزز أساسي من جين Ubiquitin-1 من Zea mays أو Zea luxurians. في تجسيم آخر، يكون عنصر معزز اللب من جين Ubiquitin-1 وتتابع نيوكليوتيد المعزز من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر (SCBV) في اتجاه تكميلي عكسي بالنسبة لبعضها البعض. في تجسيم إضافي أو بديل، يشتمل أدنى عنصر معزز أساسي على تتابع عديد النيوكليوتيد على الأقل ٦٥٪، ٧٠٪، ٧٥٪، ٨٠٪، ٨٥٪، ٩٠٪، ٩٥٪، أو ١٠٠٪ مطابقة لهوية تتابع رقم: ١ أو تكملته. في تجسيم إضافي أو بديل، يشتمل أدنى عنصر معزز أساسي على تتابع عديد النيوكليوتيد منتقى من المجموعة التي تشتمل على هوية تتابع أرقام: ١ و١٦-٤٠. في تجسيم إضافي، يشتمل أدنى عنصر معزز أساسي على تتابع عديد النيوكليوتيد منتقى من المجموعة التي تشتمل على هوية تتابع أرقام: ١ و١٦-٣٥. في تجسيم إضافي، يشتمل أدنى عنصر معزز أساسي على تتابع عديد النيوكليوتيد منتقى من المجموعة التي تشتمل على هوية تتابع أرقام: ١ و١٦-٣٠. في تجسيم إضافي، يشتمل أدنى عنصر معزز أساسي على تتابع عديد النيوكليوتيد منتقى من المجموعة التي تشتمل على هوية تتابع أرقام: ١ و١٦-٢٥. في تجسيم إضافي، يشتمل أدنى عنصر معزز أساسي على تتابع عديد النيوكليوتيد منتقى من المجموعة التي تشتمل على هوية تتابع أرقام: ١ و١٦-٢٠. في تجسيم إضافي، يشتمل أدنى عنصر معزز أساسي على تتابع عديد النيوكليوتيد بهوية تتابع رقم: ١.

في تجسيم إضافي أو بديل، يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على إكسون من جين Ubiquitin-1 و/أو إنترون من جين Ubiquitin. في تجسيم آخر، يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على إنترون من جين كحول نازع للهيدروجين. في أحد التجسيمات، يكون جزء منشأ الحمض النووي محوّل وراثياً بشكل مستقر إلى نباتات معدلة وراثياً. في أحد التجسيمات، تكون النباتات عبارة عن نباتات أحادية الفلقات monocotyledons plants. في تجسيم آخر، تكون النباتات عبارة عن نباتات ثنائية الفلقة dicotyledons plants. في تجسيم آخر، لا تكون النباتات عبارة عن نباتات أحادية الفلقة. في تجسيم آخر، لا تكون النباتات عبارة عن نباتات ثنائية الفلقة.

في تجسيم إضافي أو بديل، يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على تتابع تنظيمي عكس الاتجاه من جين Ubiquitin أو معزز الفيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر (SCBV). في تجسيم إضافي، يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على تتابع تنظيمي عكس الاتجاه من جين Ubiquitin. في تجسيم آخر، يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على تتابع تنظيمي عكس الاتجاه من جين Ubiquitin أو معزز الفيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر (SCBV).

في تجسيم إضافي، يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على عديد نيوكليوتيد لعلى الأقل ٧٥٪، ٨٠٪، ٨٥٪، ٩٠٪، ٩٥٪ أو ١٠٠٪ مطابقة لهوية تتابع رقم: ٥ أو تكملته. في تجسيم إضافي، يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على عديد نيوكليوتيد لهوية تتابع رقم: ٥ أو تكملته. في تجسيم إضافي، يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على عديد نيوكليوتيد لعلى الأقل ٧٥٪، ٨٠٪، ٨٥٪، ٩٠٪، ٩٥٪ أو ١٠٠٪ مطابقة لهوية تتابع رقم: ٦ أو تكملته. في تجسيم إضافي، يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه على عديد نيوكليوتيد لهوية تتابع رقم: ٦ أو تكملته.

في أحد التجسيمات، تشتمل كلا مجموعتي التعبير الجيني عن الجين على اثنين أو أكثر من الجينات متصلة عن طريق محول ترجمة. في تجسيم إضافي أو بديل، يتم اختيار محول الترجمة من المجموعة التي تشتمل على موقع دخول ريبوزوم داخلي internal ribosome entry site (IRES)، موقع تضفير بديل alternative splicing site ، موقع شطر ريبوزوم ribozyme cleavage site ، تتابع عديد النيوكليوتيد يشفر polynucleotide sequence coding ببتيد 2A peptide 2A ، تتابع عديد النيوكليوتيد يشفر ببتيد مشابه لـ 2A، تتابع عديد النيوكليوتيد يشفر إنتين intein، تتابع عديد النيوكليوتيد يشفر موقع شطر بروتياز protease cleavage

site، وتوليفات منها. في تجسيم إضافي أو بديل، يشتمل محول الترجمة على عنصر نازع للهيدروجين بتأثير سيس cis-acting hydrolase element (CHYSEL). في تجسيم إضافي، يكون CHYSEL عبارة عن تتابع ببتيد 2A أو مشابهة لـ 2A peptide 2A-like. في تجسيم آخر، لا يشتمل جين عكس الاتجاه بمحول الترجمة على كودون توقف ترجمة translation stop codon. في تجسيم آخر، يمكّن جزء منشأ الحمض النووي من أو يسمح بالتعبير الجيني عن على الأقل أربع جينات. في تجسيم إضافي، تكون كل الجينات الأربعة محورة وراثياً. في تجسيم آخر، يمكّن جزء منشأ الحمض النووي من التعبير الجيني عن جينات بين ثلاثة وعشرون. في تجسيم آخر، يمكّن جزء منشأ الحمض النووي من التعبير الجيني عن جينات بين أربعة وثمانية. في تجسيم إضافي أو بديل، تكون الجينات محورة وراثياً. في تجسيم آخر، على الأقل تشتمل أحد مجموعات التعبير الجيني عن الجين على تتابع عديد النيوكليوتيد يشفر encoding بروتين مندمج fusion protein. في تجسيم إضافي، يشتمل البروتين المندمج على ثلاث إلى خمس جينات.

في بعض التجسيمات، يكون التعبير الجيني عن جينات من المعزز ثنائي الاتجاه أعلى أربع أضعاف على الأقل مقارنةً بمعزز موحد الاتجاه uni-directional promoter. في بعض التجسيمات، يكون التعبير الجيني عن جينات من المعزز ثنائي الاتجاه من ثلاثة إلى عشرة أضعاف أعلى مقارنةً بمعزز موحد الاتجاه. في بعض التجسيمات، يكون التعبير الجيني عن جينات من المعزز ثنائي الاتجاه من أربعة إلى ثمانية أضعاف أعلى مقارنةً بمعزز موحد الاتجاه. في بعض التجسيمات، يتم وضع جين مرمّز للاختيار selection marker gene عند نهاية بعيدة من المعزز (أي، عند نهاية 3′ بجين مجموعة تعبير جيني مع الاتجاه من جين آخر).

في أحد السمات، يتم تقديم طريقة لتوليد نبات معدّل وراثياً يتضمن التعديل الوراثي لخلية نبات باستخدام جزء منشأ الحمض النووي مقدم في هذه الوثيقة. في سمة أخرى، يتم تقديم طريقة لتوليد generating خلية معدلة وراثياً يتضمن التعديل الوراثي للخلية باستخدام جزء منشأ الحمض النووي مقدم في هذه الوثيقة. في سمة أخرى، يتم تقديم خلية نبات يتضمن جزء منشأ الحمض النووي مقدم في هذه الوثيقة. في تجسيم إضافي أو بديل، يكون جزء منشأ الحمض النووي محوّل وراثياً بشكل مستقر إلى خلية النبات. في سمة أخرى، يتم تقديم نبات معدّل وراثياً يتضمن جزء

منشأ الحمض النووي مقدم في هذه الوثيقة. في تجسيم إضافي أو بديل، يكون جزء منشأ الحمض النووي محوّل وراثياً بشكل مستقر إلى خلايا من النبات المحور وراثياً. في سمة أخرى، يتم في هذه الوثيقة تقديم طريقة للتعبير الجيني عن جينات متعددة خلايا و/أو أنسجة نبات، يتضمن إدخال في خلايا و/أو أنسجة النبات جزء منشأ الحمض النووي مقدم في هذه الوثيقة. في تجسيم إضافي أو بديل، تكون خلايا و/أو أنسجة النبات محولة وراثياً بشكل مستقر باستخدام جزء منشأ الحمض النووي مقدم في هذه الوثيقة. في سمة أخرى، يتم تقديم ناقل ثنائي للتحول الوراثي الناتج عن الأجرعية. في أحد التجسيمات، يشتمل الناقل الثنائي على جزء منشأ الحمض النووي مقدم في هذه الوثيقة. في تجسيم آخر، يشتمل الناقل الثنائي على عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide المتوفر في هذه الوثيقة. في سمة أخرى، يتم تقديم استخدام المعزز ثنائي الاتجاه المقدم في هذه الوثيقة للتعبير الجيني متعدد التمحور في النباتات.

<u>شرح مختصر للرسومات</u>

الشكل ١ يوضح معزز نموذجي (ليس بمقياس scale الرسم) لذرة Ubi1 (ZmUbi1)، حيث يشتمل على تقريباً ٩٠٠ زوج قاعدة عنصر عكس الاتجاه عند الموضع ’5 من موقع بداية النسخ (TSS). يحتوي عنصر عكس الاتجاه على صندوق TATA (موضوع تقريباً -٣٠ زوج قاعدة من TSS)، وعنصري اتفاق صدمة حرارة متداخلين (موضوعة تقريباً -٢٠٠ زوج قاعدة من TSS). يشتمل ذلك المعزز أيضاً على حوالي ١١٠٠ زوج قاعدة عند ’3 من منطقة TSS. تحتوي منطقة ’3 هذه على تتابع موجهة مجاورة adjacent leader sequence(إكسون ZmUbi1)، وإنترون.

الشكل ٢ يوضح تجسيم نموذجي لمعزز Ubi1 ثنائي الاتجاه التخليقي مجهز، حيث يشتمل على أدنى عنصر أساسي عكس الاتجاه minUbi1P مستنسخ لمعزز ZmUbi1.

الشكل ٣ يوضح رسم تخطيطي نموذجي لـ GUS ثنائية الاتجاه ومجموعة تعبير جيني لـ yfp، تحتوي على مجموعات تعبير جيني عن جين yfp وGUS، حيث يكون كل منها متصلاً بشكل عملي بمعزز Ubi1 ثنائي اتجاه تخليقي.

الشكل ٤ يوضح خريطة بلازميد plasmid map تمثيلية لـ pDAB105801.

الشكل ٥ يوضح رسم تخطيطي لمعزز ثنائي الاتجاه نموذجي لفيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر (SCBV)، حيث يشتمل على عنصر عكس الاتجاه مستنسخ لعنصر أساسي Min-Ubi1Pminimal لمعزز SCBV.

الشكل ٦ يوضح خريطة بلازميد تمثيلية لـ pDAB105806.

الشكل ٧ يوضح رسم تخطيطي نموذجي لمجموعات التعبير الجيني عن جين YFP وGUS، حيث يكون كل منها متصلاً بشكل عملي بمعزز ثنائي الاتجاه SCBV تخليقي.

الشكل ٨أ يوضح هوية تتابع رقم: ٣، حيث تشتمل على التكامل العكسي لبولي نيوكليوتيد يتضمن معزز أدنى لب Z. mays minUbi1P (تحته خط)؛ قائد Z. mays Ubi1 (إكسون ZmUbi1؛ خط سميك)؛ وإنترون Z. mays Ubi1 (حالة سفلية). شكل ٨ب يوضح هوية تتابع رقم: ٤، حيث تشتمل على جزء من عنصر عكس الاتجاه Z. mays Ubi1، قد يقع هذا العنصر (و/أو تكامله العكسى) فى معزز Ubil تخليقى مع عنصر minUbi1P مجاور لنهايتها ٥' أو ٣'.

الشكل ٨ يوضح عروض تخطيطية نموذجية لأجزاء منشأ متعددة الجين مقدمة هنا والتى تشتمل على معزز Ubil ثنائي اتجاه تخليقى (رسم علوى). تم عرض تحولات الترجمة الوراثية باستخدام نموذج خاص.

الشكل ٩ يوضح خرائط بلازميد تمثيلية pDAB108708 وpDAB101556.

الشكل ١٠أ يوضح هوية تتابع رقم: ١، حيث تشتمل على منطقة ٢١٥ زوج قاعدة لمعزز أدنى لب Zea mays Ubiquitin-1 (minUbi1P). يوضح الشكل ١٠ب هوية تتابع رقم: ٢، حيث تشتمل على التكامل العكسي لبولي نيوكليوتيد يتضمن معزز أدنى لب Z. mays minUbi1P (تحته خط)؛ قائد Z. mays Ubi1 (إكسون ZmUbi1؛ خط سميك bold font)؛ وإنترون Z. mays Ubi1 (حالة سفلية).

الشكل ١١ يوضح هوية تتابع رقم: ٣، حيث تشتمل على معزز ثنائي الاتجاه نموذجي تخليقي Ubi1، حيث يكون التكامل العكسي لـ minUbi1P أول، وminUbi1P ثاني، تحته خط underlined.

الشكل ١٢ يوضح هوية تتابع رقم: ٤، حيث تشتمل على حمض نووي نموذجي يتضمن مجموعات التعبير الجيني عن جين YFP وGUS المحركة بواسطة معزز ثنائي الاتجاه Ubi1 تخليقي.

الشكل ١٣ يوضح هوية تتابع رقم: ٥، حيث تشتمل على معزز ثنائي الاتجاه SCBV يتضمن معزز أدنى لب minUbi1P، حيث يكون التكامل العكسي لـ minUbi1P تحته خط.

الشكل ١٤ يوضح هوية تتابع رقم: ٦، حيث تشتمل على معزز SCBV يتضمن إكسون ADH1 ٦ (تحته خط)، إنترون ٦ (خط في حالة سفلية)، وإكسون ٧ (خط سميك).

الشكل ١٥ يوضح هوية تتابع رقم: ٧، حيث تشتمل على حمض نووي يتضمن مجموعات التعبير الجيني عن جين YFP وGUS المحركة بواسطة معزز ثنائي الاتجاه SCBV نموذجي.

هوية تتابع رقم: ٨ يوضح البادئة YFP تقدمية: 5′-GATGCCTCAG TGGGAAAGG-3′. تشتمل هوية تتابع رقم: ٩ على بادئة YFP عكسية: 5′-CCATAGGTGA GAGTGGTGAC AA-3′. تشتمل هوية تتابع رقم: ١٠ على معزز إنفيرتاز تقدمي Invertase Forward Primer: 5′-TGGCGGACGA CGACTTGT-3′. تشتمل هوية تتابع رقم: ١١ على معزز إنفيرتاز عكسي Invertase Reverse Primer: 5′-AAAGTTTGGA GGCTGCCGT-3′. تشتمل هوية تتابع رقم: ١٢ على مسبار إنفيرتاز Invertase Probe: 5′-CGAGCAGACC GCCGTGTACT TCTACC-3′. تشتمل هوية تتابع رقم: ١٣ على معزز AAD1 تقدمي AAD1 Forward Primer: 5′-TGTTCGGTTC CCTCTACCAA-3′. تشتمل هوية تتابع رقم: ١٤ على معزز AAD1 عكسي: 5′-CAACATCCAT CACCTTGACT GA-3′. تشتمل هوية تتابع رقم: ١٥ على مسبار AAD1: 5′-CACAGAACCG TCGCTTCAGC AACA-3′ (انظر أيضاً جدول ٧).

الشكل ١٦ يوضح تحليل بقعة Western للتعبير المستقر عن YFP المحركة بواسطة بنية معزز ثنائي الاتجاه SCBV (pDAB108708) في نباتات ذرة T0 maize T0 plants. أظهرت النباتات التوضيحية تعبير مستقر عن YFP في الورق المحركة بواسطة عنصر معزز أدنى لب Min-Ubi1P. يشار إلى كمية البروتين التي تم إنتاجها بالأجزاء بالمليون (ppm).

الشكل ١٧ يوضح تحليل بقعة Western للتعبير المستقر عن YFP من جزء المنشأ المقارن يتضمن معزز ZmUbi1 الذي يحرك فقط التعبير الجيني عن YFP (pDAB101556)؛ لا تكون تتابع تشفير GUS متضمنة في تلك البنية. يشار إلى كمية البروتين المنتجة كأجزاء بالمليون (ppm).

الشكل ١٨ يوضح أجزاء منشأ نموذجية من تكتلات مجموعة من أربع جينات pDAB105849 (AAD1-2A-YFP plus Cry34-2A-Cry35) و pDAB105865 (YFP-2A-AAD1 plus Cry34-2A-Cry35). تشير الأسهم المظللة إلى توجيه direction النسخ من المعزز ثنائي الاتجاه. تشتمل Ubi1-mimP على تتابع نيوكليوتيد لموقع بداية النسخ عكس الاتجاه ٢٠٠ لمعزز ذرة Ubi1. تشتمل SCBV-URS على تتابع تنظيمي عكس الاتجاه لمعزز SCBV باستثناء معزز اللب (موضح في صورة سهم). تشتمل Ubi1-Int على إنترون لذرة معزز Ubi1.

الشكل ١٩ يوضح جزئي منشأ نموذجيين إضافيين من تكتلات مجموعة من أربع جينات.

الشكل ٢٠ يوضح خرائط تمثيلية لبلازميدات pDAB105818 و pDAB105748.

الأشكال ٢١أ-٢١هـ يوضح أدنى معززات لب إضافي (min-Ubi1P أو Ubi1-minP) بهوية تتابع أرقام: ١٦-٤٠.

الشكل ٢٢ يوضح خرائط تمثيلية لبلازميدات pDAB105841 و pDAB105847.

الشكل ٢٣ يوضح خرائط تمثيلية لبلازميدات pDAB105840 و pDAB105849.

الشكل ٢٤ يوضح خرائط تمثيلية لبلازميدات pDAB101917 و pDAB108719.

الشكل ٢٥ يوضح خرائط تمثيلية لبلازميدات pDAB105844 و pDAB105848.

الشكل ٢٦ يوضح خرائط تمثيلية لبلازميدات pDAB105865 و pDAB108720.

الشكل ٢٧ يوضح تتابع حمض نووي لمجموعات التعبير الجيني عن الجين لـ pDAB108719، حيث يتم توضيح كل جين وعنصر.

الشكل ٢٨ يوضح بيانات تعبير جيني عن بروتين نموذجي من بين أجزاء منشأ مختلفة تم اختبارها لـ Cry34 (الشكل ٢٨أ)، AAD-1 (الشكل ٢٨ب)، و Cry35 (الشكل ٢٨ج).

الشكل ٢٩ يوضح متواليتين نموذجيتين لبروتينات فلورية صفراء من Phialidium sp. SL-2003 (PhiYFP، GenBank AAR85349.1 ،234 a.a.) (هوية تتابع رقم: ٥١)؛ و PhiYFPv3، 234 a.a.، (هوية تتابع رقم: ٥٢).

الشكل ٣٠ يوضح تجسيمات نموذجية لمعزز Ubi1 ثنائي الاتجاه التخليقي وأجزاء منشأ مقدمة، بما في ذلك pDAB108706 (ZMUbi ثنائي الاتجاه (-٢٠٠))، pDAB108707 (ZMUbi ثنائي الاتجاه (-٩٠))، pDAB108708 (SCBV ثنائي الاتجاه (-٢٠٠))، و pDAB108709 (SCBV ثنائي الاتجاه (-٩٠)). pDAB101556 (عينة مقارنة ZmUbi1-YFP)، pDAB108715 (SCBV بدون أدنى معزز)، و pDAB108716 (ZmUbi1 بدون أدنى معزز) تعمل كأجزاء منشأ مقارنة باستخدام معززات متحدة الاتجاه.

الشكل ٣١أ يوضح نتائج التعبير الجيني النموذجية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لبروتين YFP (LCMS) بالنانوجم/سم٢. يوضح الشكل ٣١ب نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لـ YFP RNA.

الشكل ٣٢أ يوضح نتائج التعبير الجيني النموذجية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لبروتين GUS (LCMS) بالنانوجم/سم٢. يوضح الشكل ٣٢ب نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لـ GUS RNA.

الشكل ٣٣أ يوضح نتائج التعبير الجيني النموذجية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لبروتين AAD1 (LCMS) بالنانوجم/سم٢. يوضح الشكل ٣٣ب نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لـ AAD1 RNA.

الشكل ٣٤أ يوضح تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لبروتين YFP (LCMS) بالنانوجم/سم٢. المستويات غير المرتبطة بنفس الحرف فى الجدول مختلفة تماماً. يوضح الشكل ٣٤ب تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني النسبية

(V6) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لـ YFP RNA. تم إدراج القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

الشكل ٣٥أ يوضح تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لبروتين GUS (LCMS) بالنانوجم/سم٢. المستويات غير المرتبطة بنفس الحرف في الجدول مختلفة تماماً. يوضح الشكل ٣٥ب تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني النسبية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لـ GUS RNA. تم إدراج القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

الشكل ٣٦أ يوضح تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لبروتين AAD1 (LCMS) بالنانوجم/سم٢. المستويات غير المرتبطة بنفس الحرف في الجدول مختلفة تماماً. يوضح الشكل ٣٦ب تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني النسبية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لـ AAD1 RNA. تم إدراج القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

الأشكال ٣٧أ، ٣٧ب، و٣٧ج تعرض نتائج التعبير الجيني النموذجية (V10) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لبروتين YFP، AAD1، وGUS (LCMS) بالنانوجم/سم٢ على التوالي.

الأشكال ٣٨أ، ٣٨ب، و٣٨ج توضح تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V10) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لبروتين YFP، GUS، وAAD1 (LCMS) بالنانوجم/سم٢ على التوالي. تم إدراج القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية. المستويات غير المرتبطة بنفس الحرف في الجداول مختلفة تماماً.

الأشكال ٣٩أ، ٣٩ب، و٣٩ج تعرض نتائج التعبير الجيني النموذجية (R3) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لبروتين YFP، GUS، وAAD1 (LCMS) بالنانوجم/سم٢، على التوالي.

الأشكال ٤٠أ، ٤٠ب، و٤٠ج توضح تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (R3) من أجزاء المنشأ السبعة الموضحة في الشكل ٣٠ لبروتين YFP، GUS، و AAD1 (LCMS) بالنانوجم/سم٢، على التوالي. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

الشكل ٤١ يوضح أجزاء منشأ متعددة التحول الجيني الإضافية باستخدام معزز Ubi1، بما في ذلك pDAB108717 و pDAB108718.

الشكل ٤٢أ يوضح نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لـ Cry34 RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748 (ZmUbi1-YFP)، pDAB105818 (ZmUbi1-Cry34/ZmUbi1 -Cry35/ZmUbi1-AAD1)، pDAB108717 (YFP/AAD-1- ZmUbi1 ثنائي الاتجاه -Cry34-Cry35)، pDAB108718 (AAD1/YFP-ZmUbi1 ثنائي الاتجاه -Cry34-Cry35)، pDAB108719 (YFP/AAD1-SCBV ثنائي الاتجاه -Cry34-Cry35)، و pDAB108720 (AAD1/YFP - SCBV ثنائي الاتجاه --Cry34-Cry35). يوضح الشكل ٤٢ب نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لبروتين Cry34 (LCMS) من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720.

الشكل ٤٣أ يوضح نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لـ AAD1 RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720. يوضح الشكل ٤٣ب نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لبروتين AAD1 (LCMS) من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720.

الشكل ٤٤أ يوضح نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لـ YFP RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720. يوضح الشكل ٤٤ب نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لبروتين YFP (LCMS) من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748،

pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720.

الشكل ٤٥أ يوضح نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لـ Cry35 RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720. يوضح الشكل ٤٥ب نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لبروتين Cry35 (ELISA) من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720.

الشكل ٤٦ يوضح نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لـ PAT RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720.

الشكل ٤٧أ يوضح تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لـ Cry34 RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720. يوضح الشكل ٤٧ب تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لبروتين Cry34 من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

الشكل ٤٨أ يوضح تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لـ AAD1 RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720. يوضح الشكل ٤٨ب تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لبروتين AAD1 من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

الشكل ٤٩أ يوضح تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لـ YFP RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، وpDAB108720. يوضح الشكل ٤٩ب تحليل إحصائي statistical analysis لنتائج التعبير الجيني (V6) لبروتين YFP من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، وpDAB108720. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

الشكل ٥٠أ يوضح تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لـ Cry35 RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، وpDAB108720. المستويات غير المرتبطة بنفس الحرف فى الجدول مختلفة تماماً. يوضح الشكل ٥٠ب تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لبروتين Cry35 من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، وpDAB108720. تم إدراج القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

الشكل ٥١ يوضح تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لـ PAT RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، وpDAB108720. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

الأشكال ٥٢أ، ٥٢ب، ٥٢ج، و٥٢د توضح نتائج بروتين التعبير الجيني النموذجية (V10) لـ YFP، AAD1، Cry34، وCry35 على التوالي من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، وpDAB108720.

الأشكال ٥٣أ، ٥٣ب، ٥٣ج، و٥٣د توضح تحليل إحصائي لنتائج بروتين التعبير الجيني (V10) لـ YFP، AAD1، Cry34، وCry35 على التوالي من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، وpDAB108720. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

الأشكال ٥٤أ، ٥٤ب، ٥٤ج، و٥٤د توضح نتائج بروتين التعبير الجيني النموذجية (R3) لـ YFP، AAD1، Cry34، وCry35 على التوالي من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، وpDAB108720.

الأشكال ٥٥أ، ٥٥ب، ٥٥ج، و٥٥د توضح تحليل إحصائي لنتائج بروتين التعبير الجيني (R3) لـ YFP، AAD1، Cry34، وCry35 على التوالي من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، وpDAB108720. تم إدراج القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية. المستويات غير المرتبطة بنفس الحرف فى الجداول مختلفة تماماً.

شكل ٥٦ (أ-ج) يوضح نتائج نموذجية من بقعة Western لبروتين التعبير الجيني عن Cry34 (شكل ٥١أ)، Cry35 (شكل ٥١ب)، وAAD1 (شكل ٥١ج) من pDAB108718، pDAB108717، pDAB108719، وpDAB108720.

الوصف التفصيلي:

أصبح تطوير المنتجات المعدلة وراثياً transgenic products معقد بشكل كبير، التي تتطلب تهريم pyramiding جينات متعددة متحورة إلى مكان واحد. ويتطلب كل جين متحور transgene غالباً بشكل تقليدي محفز مميز للتعبير، وبذلك فإنه يتطلب محفزات متعددة لتعبر عن جينات متحورة مختلفة خلال مجموعة جين واحد. بالإضافة إلى زيادة حجم مجموعة الجين gene stack، فهذا يؤدي مراراً إلى الاستخدام المتكرر لنفس المحفز للحصول على مستويات متشابهة من أنماط التعبير للجينات المتحورة المختلفة المتحكمة في نفس الصفة. ومن المعروف أن بنيات متعددة الجينات مدفوعة بنفس المحفز تسبب إسكات الجين gene silencing، وبهذا تعمل على أن تكون المنتجات الوراثية أقل كفاءة في المجال. ويمكن للكثير من مواقع الربط لعامل النسخ transcription factor (TF) بسبب تكرار المحفز أن تسبب استنفاذ depletion لـTFs الداخلي endogenous مؤدياً إلى تخميد لعملية النسخ transcriptional inactivation. وسوف تؤثر بشكل غير مرغوب فيه إسكات الجينات المتحورة على أداء النبات المتحور وراثياً المنتج لتعبر عن

الجينات المتحورة. ربما تؤدي التتابعات المتكررة خلال الجين المتحور إلى جين متجانس homologous معاد الاتحاد recombination داخل المكان intra-locus مؤدياً إلى إعادات ترتيب rearrangements للبولي نيوكليوتيد.

يتم توفير الطرق والبنايات التي تقوم بتجميع نظام المحفز ثنائي الاتجاه bidirectional promoter system مع تنظيم ثنائي السيسترونات bicistronic organization للجينات على إما نهاية واحدة أو كلا النهايتين للمحفز، على سبيل المثال مع استخدام تتابع 2A من فيروس زوثيا أسيجنا (Thosea asigna). ويشق بروتين 2A، الذي فقط يتكون من ١٦-٢٠ حمض أميني amino acids، البولي بروتين polyprotein عند نهايته الكربوكسيلية carboxyl-terminus. ويمكن لهذا "الانشقاق الذاتي self-cleavage" أو خاصية "تخطي الريبوسوم ribosome skip" للببتيد 2A أو شبيه الببتيد 2A أن يستخدم في معالجة البولي بروتينات المنتجة الصناعية في النباتات المتحورة وراثياً. وفي تجسيم واحد يتم دمج كل من الجينات Cry34 وCry35 في مجموعة تعبير جيني واحدة، بينما يتم دمج جينات YFP (أو PhiYFP) وAAD1 في مجموعة تعبير جيني أخرى (مع إطار فردي للقراءة المفتوحة open reading frame (ORF) مع نسخة من البروتين الجيني 2A موضوعة ما بين جينين في كل التئام combination). وعلى سبيل المثال يمكن لكل من مجموعات التعبير الجيني تلك (أو أزواج جينية gene pairs) أن يتم وضعها على أي من النهايتين للمحفز ثنائي الاتجاه ليدفع ٤ جينات متحورة وراثياً باستخدام محفز فردي. وبذلك البنايات والطرق المقدمة هنا مفيدة لتجنب الاستخدام المتكرر لنفس المحفز ويقلل حجم البنايات التجارية بوضوح. بالإضافة تمد أيضاً الأربع جينات أو أكثر المدفوعة بمحفز واحد القدرة على التعبير المشترك للجينات المتحكمة في صفة واحدة.

وتُعد محفزات النباتات Plant promoters المستخدمة لأجل البحث الأساسي أو التطبيق البيوتكنولوجي بصفة عامة أحادية الاتجاه، موجهةً فقط جين واحد والذي يتم دمجه عند نهايته 3′ (أي، الاتجاه السفلي). وإنه من الضروري غالباً إدخال جينات متعددة في النباتات من أجل الهندسة الآيضية ورص الصفات وبذلك يتطلب هذا محفزات متعددة بشكل نموذجي في محاصيل المستقبل المتحورة وراثياً transgenic crops لتدفع التعبير للجينات المتعددة. وإنه من المرغوب فيه

تصميم الاستراتيجيات التي قد تحفظ رقم المحفزات المنتشرة وتسمح بتعبير منتظم مشترك في نفس الوقت لتهريم الجين gene pyramiding. وفي بعض التجسيمات، يمكن للمحفزات الثنائية الاتجاه أن تدفع نسخ وحدات النسخ transcription units المتعددة، مشتملة على RNAi، أو miRNA المصطنع، أو تتابعاتها بين الحلقية haipin-loop للRNA.

تستخدم التجسيمات هنا عملية حيث فيها محفز أحادي الاتجاه من جين الذرة يوبيكويتن-1 maize ubiquitin-1 gene (مثل، ZmUbi1) ومحفز SCBV لتصميم محفز مخلق ثنائي الاتجاه، ومثل هذا المحفز المخلق يمكن له مباشرة التعبير للجينين الاثنين حيث يوجد واحد عند كل نهاية من المحفز. وربما تسمح المحفزات المخلقة ثنائية الاتجاه لهؤلاء الموجودين في المجال ليرص stack الجينات المتحورة وراثياً في خلايا النبات والنباتات بينما يقوم بتقليل الاستخدام المتكرر لنفس المحفز ويقلل من حجم البنايات المتحورة وراثياً. وعلى نحو أكثر من ذلك ربما أيضاً يمد تنظيم التعبير للجينين الاثنين مع محفز مخلق ثنائي الاتجاه بالقدرة على التعبير المشترك للجينين الاثنين تحت نفس الظروف، مثل هذا ربما يكون مفيد، فعلى سبيل المثال عندما يساهم كلا الجينين الاثنين في صفة واحدة في المضيف. وقد تم تسجيل استخدام محفزات ثنائية الاتجاه من حيث الوظيفة في نباتات في بعض الحالات، مشتملة على CaMV 35 promoters (Barfield and Pua (1991) Plant Cell Rep. 10(6-7):308-14; Xie et al. (2001)), and the mannopine synthase promoter (mas) promoters (Velten et al. (1984) EMBO J. 3(12):2723-30; Langridge et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3219-23).

يتم توجيه بدء النسخ وتنظيم تعبير الجين في جينات النبات بواسطة عناصر مختلفة لتتابع DNA والتي مجتمعة تم ترتيبها خلال المحفز. تتكون محفزات حقيقيات النواة Eukaryotic promoters من عنصر قلب محفز أدنى minimal core promoter element (minP)، وتتابعات تنظيمية أكثر عكس الاتجاه (URSs). ويُعد عنصر المحفز الأساسي امتداد أدني لتتابع DNA المجاور الذي يُعد كافى ليوجه بدء مضبوط لعملية النسخ. ويضم أيضاً محفزات القلب Core promoters في النباتات على مناطق مقبولة مرتبطة بالبدء في النسخ، مثل صناديق CAAT

وTATA. ويقع عنصر الصندوق TATA غالباً تقريباً ٢٠ إلى ٣٥ نيوكليوتيدات عكس الاتجاه لمكان البدء في النسخ.

يُعد تنشيط activation الـminP معتمداً على الـURS، والتي بها يرتبط العديد من البروتينات ويتفاعل لاحقاً مع معقد complex بدء النسخ. ويضم الـURSs على تتابعات الـDNA التي تحدد نمط التعبير الزمني المكاني للمحفز المشتمل على URS. ويتم تحديد القطبية للمحفز غالباً بواسطة اتجاه الـminP، بينما يُعد الـURS ثنائي القطبية bipolar (أي أنه يقوم بوظيفته مستقلاً عن اتجاهه). على سبيل المثال، ربما يتم تحويل المحفز الأحادي الاتجاه القطبي المخلق CaMV 35S إلى محفز ثنائي الاتجاه بواسطة دمج minP عند نهاية 5′ من المحفز في الاتجاه المقابل opposite orientation. انظر على سبيل المثال، Xie et al. (2001) Nat. Biotechnol. 19(7):677-9.

في أمثلة خاصة لبعض التجسيمات يتم استخدام عنصر قلب محفز أدنى (minUbi1P) لمحفز Ubi1 ذرة معدل (ZmUbi1) أصلاً مشتق من السلالة الطبيعية Z. mays، B73، لهندسة محفز SCBV مخلق ثنائي الاتجاه التي ربما تقوم بوظيفة في النباتات لتقدم خصائص التحكم بالتعبير التي تُعد فريدة مع الأخذ في الاعتبار محفزات ثنائية الاتجاه متاحة سابقاً. وتشمل التجسيمات محفز SCBV الثنائي الاتجاه المخلق الذي يشمل أيضاً على تتابع نيوكليوتيد مشتقة من محفز SCBV الأصلي. وربما تشمل أيضاً تجسيمات خاصة على محفز SCBV المخلق ثنائي الاتجاه والمشتمل على إنترون (مثل، إنترون ADH) على مقربة من SCBV وعناصر تتابع minUbi1P في محفز SCBV المخلق ثنائي الاتجاه.

يضم محفز ZmUbi1 أصلاً المشتق من B73 تتابعات تقع على جينوم الذرة فيما يقرب من ٨٩٩ قاعدة من موقع بدء النسخ لـ5′، وفيما يقرب من ١٠٩٣ قاعدة من موقع بدء النسخ لـ3′. Christensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18(4):675-89 (describing a B73 ZmUbi1 gene). ويُعد محفز ZmUbi1 المعدل المشتق من B73 والذي يستخدم في بعض الأمثلة محفز ما يقرب من ٢ كيلو قاعدة والذي يحتوي صندوق TATA؛ وتقود عناصر إجماع لاثنين متداخلين من الصدمات الحرارية؛ ٨٢ أو ٨٣ نيوكليوتيد (معتمداً على مرجعية الجديلة reference strand) التتابع القريبة بالفعل من موقع بدء النسخ، التي يمكن الإشارة إليها

هنا كإكسون ZmUbi1؛ وإنترون ١٠١٥-١٠١٦ نيوكليوتيد (انظر شكل ١ على سبيل المثال). وربما تبرز بدائل أخرى لمحفز الذرة اليوبيكويتن (ubiquitin) المشتق من أنواع Zea والتركيبات الوراثية genotypes لـZea mays تتابع عالية البقاء حول عنصر minP المتكون من عنصر TATA وعناصر مجتمعة عكس الاتجاه للصدمة الحرارية. وبذلك يتم توضيح تجسيمات الاختراع بالأمثلة باستخدام تلك المنطقة عالية البقاء القصيرة (~200 nt) (مثل، SEQ ID NO: 1) لمحفز ZmUbi1 كعنصر قلب محفز أدنى لإنشاء محفزات نبات ثنائية الاتجاه مخلقة.

ويتم سرد بعض الاختصارات المعينة التي أفصح عنها في الجدول رقم ١.

جدول ١. الاختصارات المستخدمة في الإفصاح

الجملة	الاختصار
حمض باي سينكونينك bicinchoninic acid	BCA
فيروس القرنبيط الفسيفسائي cauliflower mosaic virus	CaMV
ببتيد عبور البلاستيدات الخضراء chloroplast transit peptide	CTP
إسكات الجين على أساس متجانس homology-based gene silencing	HBGS
قلب محفز أدنى ZmUbi1	minUbi1P
تضخيم قلة الربط oligo ligation amplification	OLA
المحلول الملحي المنظم بالفوسفات phosphate buffered saline	PBS
المحلول الملحي المنظم بالفوسفات phosphate buffered saline بـ٠.٠٥٪ خلال (توين) ٢٠	PBST
تفاعل سلسلة بوليميراز polymerase chain reaction	PCR
تضخيم دائرة الدلفنة rolling circle amplification	RCA

RT-PCR	reverse transcriptase PCR بإنزيم ترانسكريبتاز العكسي PCR
SNuPE	single nucleotide primer extension بادئ امتداد النيوكليوتيد الوحيد
URS	تتابع تنظيمي عكس الاتجاه
ZmUbi1	جين يوبيكوتين-1 Ubiquitin-1 gene لـZea mays

كالمستخدم هنا في أدوات التنكير والتعريف فإنها تشمل مرجعيات جمع إلا إذا كان السياق يملي إلى غير ذلك بوضوح وبدون لبس فيه.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "عبور للوراء backcrossing" إلى عملية والتي فيها يتخطى المُولد breeder ذرية الهجين hybrid progeny راجعاً إلى أحد الأبوين parents، على سبيل المثال، أول جيل هجين generation hybrid F1 F1 مع واحد من التركيبات الوراثية الأبوية parental genotypes لـF1 الهجين hybrid.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "إنترون" إلى أي تتابع حمض نووي مشتمل في جين (أو تتابع نيوكليوتيد معبر عنها للفائدة) التي يتم نسخها ولا يتم ترجمتها. وتشمل الانترونات تتابع حمض نووي غير مترجم خلال تتابع DNA معبر عنه، بالإضافة إلى التتابع المتناظر في جزيئات الـRNA المنسوخة من ذلك.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "معزول isolated" إلى مكون حيوي biological component (مشتملاً على حمض أو بروتين) قد تم فصله فعلياً، تم إنتاجه من، أو تنقيته بعيداً عن المكونات البيولوجية biological components الأخرى في خلية الكائن الحي التي فيها يحدث المكون بصورة طبيعية component naturally (أي DNA و RNA الكروموسومي chromosomal والغير كروموسومي، والبروتينات)، بينما تؤثر على تغير وظيفي أو كيميائي في المكون (على سبيل المثال، ربما يتم عزل الحمض النووي من كروموسوم بكسر الروابط الكيميائية chemical bonds التي تربط الحمض النووي إلى الـDNA المتبقي في الكروموسوم). يشمل جزيئات الحمض النووي Nucleic acid molecules والبروتينات التي قد تم "عزلها" جزيئات حمض نووي وبروتينات تم تنقيتها بواسطة طرق التنقية القياسية standard purification methods. ويحتوي

أيضاً المصطلح "معزول" على الأحماض النووية nucleic acids والبروتينات المعدة بواسطة التعبير المؤتلف في خلية المضيف host cell، بالإضافة إلى جزيئات الحمض النووي المخلق كيميائياً، والبروتينات، والببتيدات peptides.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "التعبير الجيني gene expression" إلى عملية بها يتم تحويل المعلومات المشفرة coded information على وحدة النسخ transcriptional unit للحمض النووي (مشتملاً، مثلاً الـDNA الجينومي genomic) إلى جزء عملي أو جزء غير عملي أو جزء تركيبي structural part من الخلية، غالباً مشتملاً على تخليق البروتين. قد يتم حث التعبير الجيني بالإشارات الخارجية external signals؛ على سبيل المثال، تعرض خلية، أو نسيج، أو كائن حي organism إلى العامل agent الذي يزيد أو يقلل من التعبير الجيني. ويمكن أيضاً للتعبير عن الجين أن يتم تنظيمه في أي مكان في الطريق من DNA إلى RNA إلى بروتين. ويحدث تنظيم التحكم الجيني على سبيل المثال خلال التحكمات التي تحدث على النسخ، والترجمة، ونقل RNA، والمعالجة، وتفسخ الجزيئات الوسطية مثل mRNA، أو من خلال التنشيط، أو الإخماد، أو التقسيم compartmentalization، أو تفسخ degradation جزيئات البروتين الخاصة بعد ما تم صناعتهم، أو بمجموعات من ذلك كله. وقد يتم قياس التعبير الجيني عند مستوى الـRNA أو مستوى البروتين بواسطة أي طريقة معروفة في المجال، مشتملاً على وليس الحصر بقعة نورثرن Northern blot، و RT-PCR، وبقعة ويسترن Western blot، أو فحص أو فحوصات نشاط البروتين protein activity assay في خارج الخلايا in vitro الحية، أو في مكانها in situ، أو في داخل الخلايا الحية in vivo.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "إسكات جين على أساس التجانس homology-based gene silencing" (HBGS) إلى مصطلح عام يشمل كل من إسكات الجين النسخي وإسكات الجين بعد النسخي posttranscriptional gene silencing. وقد ينتج إسكات مكان الهدف target locus بواسطة مكان إسكات غير مرتبط unlinked silencing locus من تثبيط النسخ (إسكات الجين النسخي transcriptional gene silencing ؛ TGS) أو تفسخ mRNA (إسكات الجين بعد النسخي؛ RTGS)، مدينة بإنتاج RNA المزدوج الجديلة double-stranded RNA (dsRNA) متناظر للمحفز أو تتابعات منسوخة كل على حدة. ويقترح اشتمال المكونات الخلوية

cellular components المميزة في كل عملية أن الـTGS والـPTGS التي يسببها الـdsRNA تنتج من تنويع آلية مشهورة قديمة. بالرغم من أنه تُعد المقارنة الدقيقة ما بين TGS وPTGS صعبة التحقيق بسبب أنها تعتمد عامة على تحليل أماكن الإسكات silencing loci المميزة. ويمكن لمكان الجين المتحور الواحد أن يتم توضيحه ليحفز كل من TGS وPTGS بسبب إنتاج dsRNA المتناظر للمحفز والتتابعات المنسوخة للجينات المستهدفة المختلفة. انظر على سبيل المثال Mourrain et al. (2007) Planta 225:365-79. إنها أكثر أن تُعد siRNAs الجزيئات الحقيقية actual molecules التي تحفز TGS وPTGS على التتابعات المتجانسة homologous sequences: يحتمل أن تحفز الـsiRNAs في هذا النموذج إسكات وإضافة الميثيل methylation لتتابعات متجانسة في سيس وفي ترانس خلال انتشار إضافة الميثيل في الجين المتحور إلى المحفز الداخلي endogenous promoter.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "جزئ حمض نووي nucleic acid molecule" (أو"حمض نووي" أو "بولي نيوكليوتيد") إلى هيئة البوليميرية polymeric form، التي ربما تشتمل على كل من جديلات RNA في اتجاه وعكس اتجاه النسخ، وcDNA، وDNA الجينوم، والهيئات المخلقة synthetic forms والبوليميرات المختلطة mixed polymers من السابق. وربما يشير النيوكليوتيد إلى ريبونيوكليوتيد ribonucleotide، أو دي أوكسي ريبونيوكليوتيد deoxyribonucleotide، أو هيئة معدلة من أي نوع من النيوكليوتيد. ويستخدم "جزئ الحمض النووي" هنا كمترادف لـ"الحمض النووي" و"عديد النيوكليوتيد". ويتكون الحمض النووي غالباً على الأقل من ١٠ قواعد في الطول، ما أن يذكر غير ذلك. وربما يشير المصطلح إلى جزئ RNA أو DNA غير محدد الطول. ويشمل المصطلح هيئات الـDNA المفرد الجديلة أو المزدوج الجديلة. وربما يشمل جزئ الحمض النووي على إما أو كل من النيوكلوتيدات المعدلة والتي تحدث طبيعياً والمتصلة ببعضها بواسطة روابط نيوكليوتيد طبيعية الحدوث و/أو غير طبيعية الحدوث.

ربما يتم تعديل جزيئات الحمض النووي كيميائياً أو بيوكيميائياً، أو ربما يحتوي قواعد نيوكليوتيد nucleotide bases غير طبيعية أو مشتقة، كالذي سوف يتم اختصاره بالفعل من هؤلاء من ذوي المهارة في المجال. وتشتمل مثل هذه التعديلات على سبيل المثال على علامات ترقيمية labels، أو إضافة الميثيل، أو تبديل واحد أو أكثر من النيوكليوتيدات الطبيعية الحدوث بمتماثل

analog، أو تعديلات ما بين النيوكليوتيد internucleotide modifications (مثل، الروابط الغير مشحونة uncharged linkages على سبيل المثال، الميثيل فوسفات methyl phosphonates، وفوسفوتراي استرات phosphotriesters، والفوسفوأميدات phosphoramidates، والكربامات carbamates، وهكذا؛ والروابط المشحونة charged linkages: على سبيل المثال، فوسفوروثيوات phosphorothioates، والفوسفوروداثيوات phosphorodithioates، وهكذا؛ وأشطار غير مبتوت pendent moieties فيها: على سبيل المثال: الببتيدات؛ والمقحمات intercalators: على سبيل المثال، اكريدين acridine، وسورالين psoralen، وهكذا؛ والخالبات chelators؛ والعوامل القلوية alkylators؛ والروابط المعدلة modified linkages: على سبيل المثال، ألفا أنوميرك للحمض النووي alpha anomeric nucleic acids، هكذا). ويشمل المصطلح "جزئ الحمض النووي" أيضاً على أي تكيف طوبولوجي topological conformation، مشتملة على تكيفات أحادية الجديلة single-stranded، وثنائي الجديلة double-stranded، ومضاعف ثنائي جزئياً partially duplexed، ومضاعف ثلاثي جزئياً triplexed، وفي شكل دبوس الشعر hairpinned، والدائرية circular، والمقفلة padlocked.

يجرى النسخ في اتجاه نمط من 5′ إلى 3′ بطول جديلة الـDNA. ويعني هذا أن الـRNA مصنوعة بواسطة الإضافة التتابع من ريبونيوكليوتيد 5′- تراي فوسفات ribonucleotide 5′- triphosphates إلى النهاية 3′ من السلسلة المتكونة growing chain (مع النهاية الضرورية للبيروفوسفات pyrophosphate). ربما تشير العناصر المنفصلة discrete elements في أي من جزئ الحمض النووي الخطي linear أو الدائري circular (مثل، تتابعات نيوكليوتيد خاصة) إلى أن تكون "عكس الاتجاه" بالتناسب إلى عنصر أخر لو كانوا مرتبطين أو ربما تكون مرتبطة إلى نفس الحمض النووي في اتجاه 5′ من هذا العنصر. ومشابهاً لذلك ربما تكون العناصر المنفصلة "في الاتجاه السفلي" بالتناسب إلى عنصر أخر لو كانوا مرتبطين أو ربما يتم ارتباطهم بنفس الحمض النووي في اتجاه 3′ من هذا العنصر.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "موضع القاعدة base position" إلى مكان قاعدة معطاة given base أو راسب النيوكليوتيد nucleotide residue خلال حمض نووي مصمم designated

nucleic acid. وربما يتم التعرف على الحمض النووي المصمم بالمحاذاة alignment (انظر أدناه) مع الحمض النووي بمرجعية.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "تهجين hybridization" إلى عملية التي فيها يتهجن السلاسل القليلة من النيوكليوتيدات oligonucleotides وأمثالها عن طريق الرابطة الهيدروجينية hydrogen bonding، التي تشتمل على واطسن – كريك (Watson–Crick)، أو هوجستين (Hoogsteen)، أو هوجستين العكسي (reversed Hoogsteen) للرابطة الهيدروجينية ما بين قواعد مكملة complementary bases. وبصفة عامة يتكون جزيئات الحمض النووي من قواعد نيتروجينية nitrogenous bases والتي إما من البريميدينات pyrimidines (سيتوزين cytosine (C)، يوراسيل uracil (U)، وثايمين thymine (T)) أو البيورينات purines (أدينين adenine (A) وجوانين guanine (G)). وتكون هذه القواعد النيتروجينية روابط هيدروجينية hydrogen bonds ما بين البيريميدين pyrimidine والبيورين purine، ويشير الترابط bonding ما بين البريميدين والبيورين إلى "تزاوج القواعد base pairing". وبشكل خاص أكثر A سوف ترتبط هيدروجينياً بـT أو U، وG سوف ترتبط بـC. ويشير "المكمل Complementary" إلى تزاوج القواعد الذي يحدث ما بين تتابعين معروفين اثنين للحمض النووي أو منطقتين معروفتين اثنتين لنفس تتابع الحمض النووي.

كالمستخدم هنا تشير المصطلحات "من الممكن تهجينه بشكل خاص" و"مكمل بشكل خاص" إلى درجة كافية من التكامل مثل هذ الترابط الخاص والثابت يحدث ما بين قليل من النيوكليوتيد والـRNA أو الـDNA المستهدف. ولا تحتاج سلسلة النيوكليوتيد القليلة أن تكون ١٠٠٪ متكاملة إلى التتابع المستهدف لها لكي تكون من الممكن تهجينها بشكل خاص. وتتدخل سلسلة النيوكليوتيد القليلة التي من الممكن تهجينها بشكل خاص عندما ترتبط سلسلة النيوكليوتيد القليلة إلى جزئ الـDNA والـRNA المستهدف مع الوظيفة الطبيعية للـDNA المستهدف أو للـRNA المستهدف، وهناك درجة كافية من التكامل لتجنب الترابط الغير خاص لسلسلة النيوكليوتيد القليلة إلى تتابعات غير مستهدفة تحت الظروف التي فيها يُعد الترابط الخاص مرغوباً، على سبيل المثال تحت الظروف الفسيولوجية physiological conditions في حالة الفحوصات داخل الخلايا الحية in

vivo assays أو الأنظمة systems. ويشار إلى مثل هذا الترابط كونه تهجين hybridization خاص.

سوف تختلف ظروف التهجين التي تؤدي إلى درجات خاصة من الصرامة معتمدة على طبيعة طريقة التهجين hybridization method المختارة وتركيبة composition وطول تتابعات الأحماض النووية المهجنة hybridizing nucleic acid. بصفة عامة سوف تساهم درجة الحرارة للتهجين والقوة الأيونية ionic strength (خاصة تركيز Na+ concentration و/أو تركيز Mg2+) لمنظم التهجين hybridization buffer في صرامة التهجين، بالرغم من أن أوقات الغسيل wash times أيضاً تؤثر في الصرامة stringency. وقد تم شرح الحسابات التي تتعلق بظروف التهجين المطلوبة للحصول على درجات خاصة من الصرامة في Sambrook et al. (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, chs. 9 and 11.

كالمستخدم هنا يشمل المصطلح "ظروف الصارمة stringent conditions" الظروف التي تحتها سوف يحدث التهجين فقط لو كان هناك أقل من ٥٠٪ متصل بالخطأ ما بين جزئ التهجين والDNA المستهدف. وتشمل "الظروف الصارمة" على مستويات خاصة أكثر من الصرامة. وبذلك كالمستخدم هنا، سوف لا يتم التهجين في ظروف "الصرامة المتوسطة moderate stringency" هي التي تحتها الجزيئات التي فيها أكثر من ٥٠٪ متصل بالخطأ؛ وسوف لا يتم التهجين في ظروف من "الصرامة العالية high stringency" التي فيها تتابعات بأكثر من ٢٠٪ اتصال بالخطأ؛ وظروف "الصرامة العالية جداً" هي تلك التي فيها تتابعات بأكثر من ١٠٪ اتصال بالخطأ والتي لا يتم فيها التهجين.

في تجسيمات خاصة يمكن للظروف الصارمة أن تشمل التهجين عند ٦٥ درجة مئوية، وتالياً لذلك بعمليات غسيل washes عند ٦٥ درجة مئوية بـ0.1x SSC/0.1٪SDS لمدة ٤٠ دقيقة.

ويعد التالي ظروف تهجين ممثلة غير قاصرة:

صرامة عالية جداً: التهجين في محلول منظم 5x SSC buffer عند ٦٥ درجة مئوية لمدة ١٦ ساعة؛ وتتم عملية الغسل في محلول منظم 2x SSC في درجة حرارة الغرفة room temperature لمدة ١٥ دقيقة لكل واحدة، وتتم عملية الغسل في محلول منظم 0.5x SSC عند ٦٥ درجة مئوية لمدة ٢٠ دقيقة لكل واحدة.

صرامة عالية: التهجين في محلول منظم 5x-6x SSC عند ٦٥-٧٠ درجة مئوية لمدة ١٦-٢٠ ساعة؛ وتتم عملية الغسل في محلول منظم 2x SSC في درجة حرارة الغرفة لمدة ٥-٢٠ دقيقة لكل واحدة، وتتم عملية الغسل في محلول منظم 1x SSC عند ٥٥-٧٠ درجة مئوية لمدة ٣٠ دقيقة لكل واحدة.

صرامة متوسطة: التهجين في محلول منظم 6x SSC في درجة حرارة الغرفة إلى ٥٥ درجة مئوية لمدة ١٦-٢٠ ساعة؛ وتتم عملية الغسل على الأقل مرتين في محلول منظم 2x-3x SSC في درجة حرارة الغرفة إلى ٥٥ درجة مئوية لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة لكل واحدة.

قد يتبقى في بعض التجسيمات الخاصة جزيئات الحمض النووي الممكن تهجينها بخاصة مرتبطة تحت ظروف تهجين صرامة عالية جداً. وقد يتبقى في تلك التجسيمات وغيرها جزيئات الحمض النووي الممكن تهجينها بخاصة مرتبطة تحت ظروف تهجين صرامة عالية جداً. وربما قد يتبقى في تلك التجسيمات وغيرها جزيئات الحمض النووي الممكن تهجينها بخاصة مرتبطة تحت ظروف تهجين متوسطة الصرامة.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "قليل النيوكليوتيد" إلى بوليمير polymer حمض نووي قصير. وربما يتم تكوين قليل النيوكليوتيدات بكسر أجزاء الأحماض النووية الطويلة longer nucleic acid segments, أو ببلمرة polymerizing المواد السابقة للنيوكليوتيد nucleotide precursors الفردي. وتسمح المخلقات الآلية بتخليق قليل النيوكليوتيدات إلى العديد من مئات تزاوج القواعد في الطول. وربما يتم استخدام قليل النيوكليوتيد كمجسات probes للكشف عن الـDNA والـRNA لأنها ربما ترتبط إلى تتابع نيوكليوتيد مكمل. وربما يتم استخدام قليل النيوكليوتيدات المتكون من الـDNA (أوليجو دى أوكسي ريبونيوكليوتيدات oligodeoxyribonucleotides) في PCR، والذي يُعد تقنية لتضخيم amplification تتابعات

DNA الصغيرة. وفي الPCR تشير قليل النيوكليوتيد بشكل نموذجي إلى "البادئ primer" الذي يسمح لDNA بوليميراز ليطيل من قليل النيوكليوتيد وينسخ الجديلة المكملة complementary strand.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "تعريف التتابع sequence identity" أو "التعريف identity" إلى سياق فيه ربما يشير تتابعى حمض نووي اثنين أو بولي ببتيد اثنين إلى راسب التتابعين الاثنين واللذان يُعدا نفس التتابعين عندما يتم التراص لأجل تطابق أقصى على شباك مقارنة خاص.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "نسبة تعريف التتابع" إلى القيمة التي يتم تحديدها بمقارنة تتابعين بمحاذاة قصوى (مثل، تتابعات حمض نووي، وتتابعات حمض أميني amino acid sequences)، من خلال شباك مقارنة حيث ربما يضم جزء التتابع في شباك المقارنة على إضافات additions أو حذوفات deletions (أي، فجوات gaps) بالمقارنة بالتتابع المرجعى (التي لا تضم إضافات أو حذوفات) لأجل تراص أقصى للتتابعين الاثنين. ويتم حساب النسبة بتحديد رقم المواضع التي عندها يحدث النيوكليوتيد المطابق أو راسب الأحماض النووية amino acid residue في كلا التتابعين لإنتاج عدد من المواضع المتصلة matched positions، وبقسمة رقم مواضع الاتصال على الرقم الكلي للمواضع في شباك المقارنة، ويتم ضرب النتيجة في ١٠٠ لإنتاج النسبة المئوية لتعريف التتابع.

وتعد الطرق لتراص التتابعات للمقارنة معروفة جيداً في المجال. ويتم توضيح البرامج ولوغاريتمات algorithms التراص في على سبيل المثال: Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444; Higgins and Sharp (1988) Gene 73:237-44; Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151-3; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang et al. (1992) Comp. Appl. Biosci. 8:155-65; Pearson et al. (1994) Methods Mol. Biol. 24:307-31; Tatiana et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174:247-50. وقد يوجد اعتبار مفصل لطرق التراص للتتابع وحسابات التجانس

homology calculations، مثلاً، Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10.

يُتاح المركز القومي للمعلومات الحيوية التكنولوجية National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST™؛ Altschul et al. (1990)) من العديد من المصادر، بما في ذلك المركز القومي للمعلومات الحيوية التكنولوجية (Bethesda, MD)، وعلى شبكة الإنترنت، للاستخدام فيما يتعلق بالعديد من برامج تحليل analysis programs التتابعات. يُتاح وصف لكيفية تحديد تطابق تتابع مستخدمًا هذا البرنامج على الإنترنت بموجب القسم "مساعدة" لـ BLAST™. من أجل مقارنات وظيفة تتابعات الحمض النووي، فإنه يمكن استخدام وظيفة "تتابعات Blast 2" لبرنامج BLAST™ (Blastn) مستخدماً المتغيرات الافتراضية default parameters. سوف تؤدي تتابعات الحمض النووي ذات التشابه الأكبر للتتابعات المرجعية إلى نسبة تطابق زائدة عند قياسها بهذه الطريقة.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "مرتبط عملياً" إلى سياق حيث يكون تتابع الحمض النووى الأول مرتبطة عملياً بتتابع الحمض النووى الثانى عندما يكون تتابع الحمض النووى الأول في علاقة مع تتابع الحمض النووى الثانى. فعلى سبيل المثال، يكون المحفز مرتبط عملياً بتتابع التشفير عندما يؤثر المحفز على النسخ أو التعبير لتتابع التشفير coding sequence. وعندما تنتج بإعادة الالتئام، فإنه تُعد تتابعات الأحماض النووية المرتبطة عملياً بصفة عامة متماسة وحيث يكون من الضروري لربط منطقتين اثنتين لتشفير البروتينات protein-coding regions في نفس إطار القراءة reading frame. بالرغم من أنه لا تحتاج العناصر أن تكون متماسة لكي تكون مرتبطة عملياً.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "محفز" إلى منطقة من الـDNA التي تقع بصفة عامة عكس الاتجاه (في اتجاه منطقة 5′ من الجين) التي يتم احتياجها في عملية النسخ. وربما تُتيح المحفزات التنشيط الكافي أو كبت repression الجين التي تتحكم فيه. وربما يحتوي المحفز على تتابعات خاصة التي يتم معرفتها بواسطة عوامل النسخ. وتلك العوامل ربما ترتبط بتتابعات محفز الـDNA وتؤدي إلى إعادة توظيف الـRNA بوليميراز، والذي عبارة عن إنزيم يخلق RNA من منطقة التشفير coding region للجين.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "يتحول" أو "ينقل" إلى عملية حيث ينقل الفيروس أو الناقل vector جزيئات الحمض النووي إلى الخلية. والخلية التي "يتم تحويلها" بواسطة جزئ حمض نووي "يتم نقله" إلى الخلية عندما يصبح جزئ الحمض النووي يمكن مضاعفته بثبات بواسطة الخلية، إما بواسطة دمج جزئ الحمض النووي إلى جينوم خلوي cellular genome أو بمضاعفة يصبوغية episomal replication (جرثومية). وكالمستخدم هنا يشمل المصطلح "تحويل transformation" كل التقنيات التي بها يمكن لجزئ الحمض النووي إدخاله في مثل هذه الخلية. على سبيل المثال وليس الحصر: نقل المادة الوراثية بنواقل فيروسية viral vectors؛ وتحويل باستخدام نواقل بلازميدية plasmid vectors؛ وعملية كهربية electroporation (Fromm et al. (1986) Nature 319:791-3)؛ ونقل الشحم lipofection (Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7)؛ والحقن المجهري microinjection (Mueller et al. (1978) Cell 15:579-85)؛ ونقل بواسطة أجروباكتيريم Agrobacterium-mediated transfer (Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7)؛ وارتشاف الDNA المباشر؛ وتحويل بواسطة ويسكرز whiskers-mediated transformation ، وانفجار بمقذوف مجهري microprojectile bombardment (Klein et al. (1987) Nature 327:70).

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "جين معدل وراثياً" إلى تتابع حمض نووي خارجي exogenous nucleic acid. في مثال واحد، الجين المعدل وراثياً هو تتابع جين (مثل، جين مقاوم لمبيدات الأعشاب)، وجين يشفر لمركب مفيد صناعياً أو صيدلياً، أو جين يشفر لصفة مرغوبة زراعياً. وفي مثال أخر، يعد الجين المعدل وراثياً تتابع حمض نووي ضد الإحساس antisense، حيث يثبط التعبير عن تتابع الحمض النووي ضد الإحساس تعبير تتابع الحمض النووي المستهدف. وربما يحتوي الجين المعدل وراثياً على تتابعات تنظيمية مرتبطة عملياً بالجين المعدل وراثياً (مثلاً، محفز). وفي بعض التجسيمات يعد الجين المعدل وراثياً عبارة عن تتابع حمض نووي للفائدة. بالرغم من إنه في تجسيمات أخرى يعد تتابع الحمض النووي للفائدة تتابع حمض نووي داخلي، حيث تكون النسخ الإضافية من الجينوم لتتابع الحمض النووي الداخلية مرغوبة، أو تتابع الحمض

النووي الذى يكون في اتجاه ضد الإحساس مع الأخذ في الاعتبار إلى تتابع جزئ الحمض النووي المستهدف في الكائن الحي المضيف host organism.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "ناقل" إلى جزئ حمض نووي يمكن إدخاله إلى الخلية، وبذلك يتم إنتاج خلية متحولة transformed cell. وربما يشمل الناقل على تتابعات حمض نووي تُتيح لها المضاعفة في الخلية المضيفة، حيث تكون أصل المضاعفة. وتشمل الأمثلة على وليس الحصر، بلازميد plasmid، أو كوزميد cosmid، وباكتيريوفاج bacteriophage، أو فيروس الذي يحمل DNA خارجي إلى داخل خلية. ويمكن أيضاً للناقل أن يشمل على واحد أو أكثر من الجينات، و/أو جزيئات ضد الإحساس antisense molecules، و/أو جينات علامة منتقاه، والعناصر الجينية الأخرى المعروفة في المجال. وربما ينقل، أو يحول، أو يصيب الناقل الخلية، وبذلك يجعل الخلية تعبر عن جزيئات الحمض النووي و/أو البروتينات المشفرة بواسطة الناقل. وربما يشمل الناقل اختيارياً على المواد التي تساعد على تحقيق دخول جزئ الحمض النووي إلى داخل الخلية (مثلاً، ليبوسوم liposome).

كالمستخدم هنا يشمل المصطلح "نبات" على النباتات وأجزاء النبات مشتملاً ولا يقتصر على خلايا النبات وأنسجة النبات مثل الأوراق leaves، والسيقان stems، والجذور roots، والأزهار flowers، وحبوب اللقاح pollen، والبذور seeds. ويُعد صنف النباتات التي يمكن استخدامها في الاختراع الحالي بصفة عامة بشكل واسع كصنف النباتات الأعلى أو الأقل والتي من الممكن تعرضها للطفرة mutagenesis مشتملة على كاسيات البذور angiosperms (نباتات مونوكوتيليدونس monocotyledonous وداي كوتيليدونس dicotyledonous)، وعاريات البذور gymnosperms، والسرخسيات ferns، والطحالب متعددة الخلايا multicellular algae. وبذلك يشمل "نبات" على نباتات مونوكوتيليدونس monocotyledons plants ونباتات داي كوتيليدونس dicotyledons plants. وتشمل أمثلة نباتات داي كوتيليدونس على التبغ tobacco، وأرابيدوبسيس Arabidopsis، وفول الصويا soybean، والطماطم tomato، والبابايا papaya، والكانولا canola، والقطن cotton، وعباد الشمس sunflower، والبرسيم alfalfa، والبطاطس potato، والعنب grapevine، والبسلة pigeon pea، والبازلاء pea، والكرنب Brassica، والحمص chickpea، وبنجر السكر sugar beet، وبذور اللفت

rapeseed، والبطيخ watermelon، والشمام melon، والفلفل pepper، والفول السوداني peanut، والقرع pumpkin، والفجل radish، والسبانخ spinach، والكوسا squash، والبروكلي broccoli، والملفوف cabbage، والجزر carrot، والقرنبيط cauliflower، والكرفس celery، والكرنب الصيني Chinese cabbage والخيار cucumber، والباذنجان eggplant، والخس lettuce. وتشمل أمثلة نباتات مونوكوتيليدونس على الذرة corn، والأرز rice، وقصب السكر sugarcane، والشعير barley، والجاودار rye، والذرة الرفيعة sorghum، وبساتين الفاكهة orchids، والخيزران bamboo، والموز banana، وأعشاب الأحواض cattails، والزنابق lilies، والشوفان oat، والبصل onion، والذرة العويجة millet (دخن)، والتريتيكال triticale.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "مادة نبات plant material" إلى الأوراق، والسيقان، والجذور، والأزهار، أو أجزاء الزهرة، والفاكهة، وحبوب اللقاح، وخلايا البيض egg cells، وخلايا الزيجوت zygotes، والبذور، والقصاصات cuttings، استنباتات الخلايا أو الأنسجة، أو أي جزء أو منتج نبات. وفي بعض التجسيمات يشمل مادة النبات على كوتيليدون cotyledon أو ورقة leaf.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "مفتاح الترجمة" إلى آلية عند نهاية جين تسمح بالترجمة لجين حالي في الاتجاه السفلي. ويمكن لآلية مفتاح الترجمة أن يتم توظيفه عند مستوى الحمض النووي (على سبيل المثال، مكان دخول الريبوسوم الداخلي لحقيقيات النواة أو الفيروس eukaryotic internal ribosome entry site (IRES)، أو مكان ربط بديل alternative splicing site، أو مكان كسر ريبوزيم ribozyme cleavage site) أو مستوى ببتيد/بروتين (على سبيل المثال، ببتيد 2A، أو شبيه الببتيد 2A، أو ببتيد إنتاين، أو مكان كسر البروتياز protease cleavage site).

وتُعد تلك الآليات لمفتاح الترجمة عند مستوى الحمض النووي أو عند مستوى الببتيد/البروتين معروفة في المجال. انظر، مثلاً، Z. Li, H.M. Schumacher, et al. (2010) J. Biotechnol. 145(1): 9-16; Y. Chen, K. Perumal, et al. (2000) Gene Expr. 9(3):133-143; T.D. Dinkova, H. Zepeda, et al. (2005) Plant J. 41(5): 722-731; Y.L. Dorokhov, M.V. Skulachev, et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99(8): 5301-5306; O. Fernandez-Miragall and C.

Hernandez (2011) PLoS One 6(7): e22617; E. Groppelli, G.J. Belsham, et al. (2007) J. Gen. Virol. 88(Pt 5): 1583-1588; S.H. Ha, Y.S. Liang, et al. (2010) Plant Biotechnol J. 8(8): 928-938; A. Karetnikov and K. Lehto (2007) J. Gen. Virol. 88(Pt 1): 286-297; A. Karetnikov and K. Lehto (2008) Virology 371(2): 292-308; M.A. Khan, H. Yumak, et al. (2009) J. Biol. Chem. 284(51): 35461-35470; and D.C. Koh, S.M. Wong, et al. (2003) J. Biol. Chem. 278(23): 20565-20573)، والمحتوى لتلك المدمجة هنا بمرجعية إلى مجاميعهم. وقد تم إفشاء بنايات التعبير المتعدد الجيني المحتوي إنتينات معدلة في براءات الاختراع الأمريكية أرقام ٧,٠٢٦,٥٢٦، و٧,٧٤١,٥٣٠، بالإضافة إلى تطبيق براءة الاختراع الأمريكية ٢٠٠٨/٠١١٥٢٤٣.

كالمستخدم هنا يشير المصطلح "علامة من الممكن انتقائها selectable marker" أو "جين علامة من الممكن انتقائه selectable marker gene" إلى جين يتم استخدامه اختيارياً في تحويل النبات لـ ، على سبيل المثال، حماية خلايا النبات من العامل المختار أو يمد بمقاومة resistance/سماحية tolerance إلى العامل المختار selective agent. وتستقبل فقط هذه الخلايا أو النباتات علامة وظيفية من الممكن انتقائها والتي تعد قادرة على القسمة أو النمو تحت ظروف تشتمل على عامل مختار. وتشمل أمثلة العوامل المختارة على سبيل المثال، المضادات الحيوية antibiotics، والمشتملة على سبيكتينوميسين spectinomycin، ونيوميسين neomycin، وكاناميسين kanamycin، وباروميسين paromomycin، وجنتاميسين gentamicin، وهجيرومايسن hygromycin. وتشمل العلامات التي يمكن انتقائها على جين لإنزيم نيوميسين فوسفوترانسفيراز neomycin phosphotransferase (npt II)، التي تعبر عن إنزيم يشمل مقاومة إلى المضاد الحيوي كاناميسين antibiotic kanamycin، والجينات للمضادات المتعلقة كالنيوميسين antibiotics neomycin، والباروميسين paromomycin، والجنتاميسين gentamicin، وG418، أو الجين لإنزيم هيجروميسين فوسفوترانسفيراز hygromycin phosphotransferase (hpt)، التي تعبر عن إنزيم مشتمل على مقاومة للهيجرومايسين. وقد تشمل جينات يتم انتقائها أخرى على جينات تشفير لمقاومة مبيد الأعشاب

مشتملة على بار Bar (مقاومة ضد BASTA® (جلوفوسينات أمونيوم glufosinate ammonium)، أو فوسفينوتريسين phosphinothricin (PPT))، واسيتولاكتات سنسيز acetolactate synthase (ALS، مقاومة ضد المثبطات inhibitors مثل سلفونيل يوريا sulfonylureas (USs)، وإميدازولوينونات imidazolinones (IMIs)، وتراي زولوبيريميدين triazolopyrimidines (TPs)، وبيريميدنيل أوكسيبنزوات pyrimidinyl oxybenzoates (POBs)، وسلفونيل أمينو كربونيل تراي أزولينونات sulfonylamino carbonyl triazolinones التي تمنع الخطوة الأولى من تخليق الأحماض الأمينية متفرعة السلسلة branched-chain amino acids)، والجليفوسات glyphosate ، و٢،٤-D، ومقاومة المعدن metal resistance أو الحساسية sensitivity. ويشير المصطلح "علامة إيجابية marker-positive" إلى النباتات التي قد تم تحويلها لتشمل جين العلامة الذي من الممكن انتقائه.

قد يتم دمج العديد من العلامات التي يمكن كشفها وانتقائها إلى ناقل التعبير المختار ليسمح بالتعرف وانتقاء النباتات المتحولة transformed plants، أو المتحولين transformants. وهناك العديد من الطرق المتاحة للتأكد من التعبير لعلامات الانتقاء في النباتات المتحولة، والتي تشتمل على سبيل المثال على الDNA والPCR (تفاعل سلسلة بوليميراز polymerase chain reaction)، وبقعة ثوثرن Southern blotting، وبقعة الRNA، والطرق المناعية immunological methods للكشف عن البروتين المعبر عنه من الناقل، مثلاً، البروتين المترسب precipitated protein الذي يتوسط لمقاومة فوسفوينوثرسين phosphinothricin resistance، أو بروتينات أخرى مثل جينات المسجل بيتا- جلوكرونيداز β-glucuronidase (GUS)، ولسيوفيراز luciferase، وبروتين الضوء الأخضر green fluorescent protein (GFP)، وDsRed، وبيتا- جالاكتوسيداز β-galactosidase، وكلورامفينيكول أسيتل ترانسفيراز chloramphenicol acetyltransferase (CAT)، وألكالين فوسفاتيز alkaline phosphatase، وأمثال ذلك (انظر Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 2001).

وتستخدم جينات العلامة التي من الممكن انتقائها لاختيار الخلايا المتحولة أو الأنسجة. وتشمل جينات العلامة التي من الممكن انتقائها على جينات مشفرة لمقاومة المضاد الحيوي antibiotic resistance، مثل هؤلاء المشفرين لإنزيم نيوميسين فوسفوترانس فيراز neomycin II phosphotransferase II (NEO) وهيجروميسين فوسفوترانس فيراز hygromycin phosphotransferase (HPT) بالإضافة إلى جينات مانحة مقاومة لمركبات مبيدات الأعشاب. وتشفر جينات مقاومة لمبيد الأعشاب Herbicide resistance genes بصفة عامة لبروتين معدل مستهدف غير حساس إلى مبيد الأعشاب أو لإنزيم الذي يحلل أو يزيل سمية detoxifies مبيد الأعشاب في النبات قبل أن يعمل. على سبيل المثال مقاومة إلى جليوفوسات glyphosate أو التي تم الحصول عليها باستخدام جينات مشفرة لإنزيمات مستهدفة مطفرة mutant target enzymes، مثلاً، ٥- إينوبيروفيل شيكيمات-٣- فوسفات سنسيز 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS). وقد تم إفشاء الجينات Genes والمطفرات mutants لـEPSPS في براءة الاختراع الأمريكية أرقام ٤,٩٤٠,٨٣٥ ، و٥,١٨٨,٦٤٢، و٥,٣١٠,٦٦٧، و٥,٦٣٣,٤٣٥، و٥,٦٣٣,٤٤٨، و٦,٥٦٦,٥٨٧. وقد تم الحصول على مقاومة لجليوسينات أمونيوم glufosinate ammonium، وبرومو أوكسينيل bromoxynil، و٤،٢- داي كلوروفينوأوكسي أسيتات 2,4-dichlorophenoxyacetate (D-٤،٢) باستخدام جينات بكتيرية bacterial genes مشفرة لفوسفينوثريسن أسيتيل ترانسفيراز encoding phosphinothricin acetyltransferase، أو نيترايليز nitrilase، أو ٤،٢- داي كلوروفينوكسي أسيتات مونو أوكسجينيز 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase، التي تزيل سمية مبيدات الأعشاب كل على حدة. وقد تم إفشاء إنزيمات/جينات لمقاومة/سماحية جلوفوسينات في براءات الاختراع الأمريكية أرقام ٥,٢٧٣,٨٩٤، و٥,٢٧٦,٢٦٨، و٥,٥٥٠,٣١٨، و٥,٥٦١,٢٣٦. وقد تم إفشاء الإنزيمات Enzymes/الجينات سابقاً لمقاومة D-٤،٢ في براءات الاختراع أرقام ٦,١٠٠,٤٤٦، و٦,١٥٣,٤٠١، بالإضافة إلى تطبيقات براءة الاختراع الأمريكية ٢٠٠٩/٠٠٩٣٣٦٦ وبراءة الاختراع الدولية ٢٠٠٧/٠٥٣٤٨٢. وقد تم إفشاء الإنزيمات/الجينات للنيتريليز سابقاً في براءة الاختراع الأمريكية رقم ٤,٨١٠,٦٤٨.

يمكن لمبيدات الأعشاب الأخرى تثبيط نقطة النمو أو النسيج الإنشائي، مشتملة على إيميدازولينوان imidazolinone أو سلفونيل يوريا sulfonylurea، وتم توضيح جينات للمقاومة/السماحية لحمض أسيتوهيدروكسي سنسيز acetohydroxyacid synthase (AHAS) وأسيتولاكتات سنسيز (ALS) لمبيدات الأعشاب تلك. وقد تم إفشاء الجينات والمطفرات لـAHAS والمطفرات في براءات الاختراع أرقام ٤,٧٦١,٣٧٣، و٥,٣٠٤,٧٣٢، و٥,٣٣١,١٠٧، و٥,٨٥٣,٩٧٣، و٥,٩٢٨,٩٣٧. وقد تم إفشاء الجينات والمطفرات لـALS في براءات الاختراع أرقام ٥,٠١٣,٦٥٩، و٥,١٤١,٨٧٠.

تشمل جينات مقاومة لجليوفوسات Glyphosate resistance genes جينات ٥- إينوبيروفيل شيكيمات-٣- فوسفات سنسيز mutant 5-enolpyruvylshikimate-3 -phosphate synthase (EPSPs) المطفرة (بواسطة إدخال حمض نووي معاد الاتحاد و/أو هيئات متعددة لتخليق الطفرة في الخلايا الحية لجينات EPSPs الأصلية)، وجينات aroA وجينات جليوفوسات أستيل ترانسفيراز (GAT)، كل على حدى). وتشمل جينات المقاومة لمركبات الفوسفينو الأخرى على جلوفوسينات (جينات فوسفينوثريسن أسيتل ترانسفيراز phosphinothricin acetyl transferase (PAT) من أنواع الستربتومايسيس Streptomyces species، مشتملة على ستربتومايسيس هيجروسكوبيكس Streptomyces hygroscopicus وستريبتومايسيس فيريديكروماجينز Streptomyces viridichromogenes)، وأحماض بيريدينوكسي pyridinoxy أو فينوكسي بروبيونيك phenoxy proprionic وسيكلوهيكسونز cyclohexones (جينات تشفير مثبط inhibitor-encoding genes الـACCase). وقد تم توضيح جينات المقاومة/السماحية لمبيد الأعشاب لأستيل كوإنزيم A coemzyme كربوكسيليز carboxylase (ACCase) في براءات الاختراع الأمريكية أرقام ٥,١٦٢,٦٠٢ و٥,٤٩٨,٥٤٤.

يمكن الحصول على جزئ DNA مشفر لجين aroA مطفر تحت انضمام ATCC رقم ٣٩٢٥٦، ويتم إفشاء تتابع النيوكليوتيد للجين المطفر mutant gene في براءة الاختراع الأمريكية رقم ٤,٧٦٩,٠٦١ لـ Comai، والتطبيق الأوروبي لبراءة الاختراع رقم ٠ ٣٣٣ ٠٣٣ لـ Kumada et al.، وبراءة الاختراع رقم ٤,٩٧٥,٣٧٤ لـ Goodman et al، وإفشاء تتابعات نيوكليوتيد لجينات إنزيم جلوتامين سنستايز glutamine synthetase genes التي تمنح مقاومة لمبيدات الأعشاب

مثل L-فوسفينوثريسن L-phosphinothricin. وتم تقديم تتابع النيوكليوتيد لجين PAT في الطلب الأوربى رقم ٢٤٦ ٢٤٢ ٠ لـ Leemans et al، وتصف أيضاً DeGreef et al., Bio/Technology 7:61 (1989) إنتاج نباتات متحورة وراثياً التي تعبر عن جينات خيمرية بار مشفرة chimeric bar genes coding إلى نشاط PAT. ويُعد من الأمثلة التي توضح الجينات المانحة لمقاومة إلى أحماض فينوكسي بروبيونيك phenoxy proprionic acids وسيكلوهيكسونز cyclohexones، مشتملة على سيزوكسيدم sethoxydim وهالوكسيفوب haloxyfop، جينات الـAcc1-S1، وAcc1-S2، وAcc1-S3، والجينات الموضحة بواسطة Marshall et al., Theon. Appl. Genet. 83:435 (1992). وتم توضيح جينات GAT القادرة على منح مقاومة جليفوسات في براءة الاختراع الدولية ٢٠٠٥٠١٢٥١٥ لـ Castle et al. وتم توضيح الجينات المانحة مقاومة لمبيدات الأعشاب D-٤،٢، وفوب fop، وبيريديل أوكسي أوكسين pyridyloxy auxin في طلب البراءة الأمريكى رقم مسلسل ١١/٥٨٧,٨٩٣ وبراءة الاختراع الدولية ٢٠٠٥١٠٧٤٣٧.

يمكن لمبيدات الأعشاب الأخرى تثبيط التخليق الضوئي photosynthesis ، ومنها ترايازين triazine (psbA و1s+) أو بنزونيتريل benzonitrile (جين نيتريليز nitrilase gene). وتصف Przibila et al., Plant Cell 3:169 (1991) تحويل الكلاميدوموناس Chlamydomonas بالبلازميدات plasmids المشفرة لجينات psbA المطفرة. ويتم إفشاء تتابعات النيوكليوتيد لجينات النيتريليز في براءة الاختراع الأمريكية رقم ٤,٨١٠,٦٤٨ إلى ستوكر Stalker، وجزيئات الـDNA المحتوية على تلك الجينات تُعد متاحة تحت انضمام ATCC للأرقام ٥٣٤٣٥، و٦٧٤٤١، و٦٧٤٤٢. وتم وصف تكون نسائل أو التعبير للـDNA المشفر لجلوتاثيون S- ترانسفيراز S-transferase glutathione بواسطة Hayes et al., Biochem. J. 285:173 (1992).

لأغراض الاختراع الحالي تشمل جينات العلامات المنتقاه وليس الحصر على جينات التشفير: نيوميسن فوسفوترانسفيراز neomycin phosphotransferase II II Fraley et al. (1986) (CRC Critical Reviews in Plant Science 4:1-25)؛ وسيانامید هيدراتيز cyanamide hydratase Maier-Greiner et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA)

88:4250-4264)؛ واسبرتات كيناز aspartate kinase؛ وداي هيدروداي بيكولينات سنسيز dihydrodipicolinate synthase (Perl et al. (1993) Bio/Technology 11:715-718)؛ وتريبتوفان ديكربوكسيلاز tryptophan decarboxylase (Goddijn et al. (1993) Plant Mol. Bio. 22:907-912)؛ وداي هيدرو داي بيكولينات سنسيز dihydrodipicolinate synthase واسبارتاد كيناز المنزوع الحساسية desensitized aspartade kinase (Perl et al. (1993) Bio/Technology 11:715-718)؛ وجين بار (Toki et al. (1992) Plant Physiol. 100:1503-1507; and Meagher et al. (1996), bar gene Crop Sci. 36:1367)؛ وتريبتوفان ديكربوكسيلاز tryptophan decarboxylase (Goddijn et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:907-912)؛ ونيوميسن فوسفوترانسفيراز (NEO) neomycin phosphotransferase (Southern et al. (1982) J. Mol. Appl. Gen. 1:327)؛ وهيجروميسين فوسفوترانسفيراز hygromycin phosphotransferase (HYG أو HPT) (Shimizu et al. (1986) Mol. Cell Biol. 6:1074)؛ وداي هيدرو فولات ريداكتاز dihydrofolate reductase (DHFR) (Kwok et al. (1986) PNAS USA 4552)؛ وفوسفينوثريسين استيل ترانسفيراز phosphinothricin acetyltransferase (DeBlock et al. (1987) EMBO J. 6:2513)؛ وحمض ٢،٢-داي كلوروبروبيونيك ديهالوجيناز 2,2-dichloropropionic acid dehalogenase (Buchanan-Wollatron et al. (1989) J. Cell. Biochem. 13D:330)؛ وحمض اسيتوهيدروكسي سنسيز acetohydroxyacid synthase (Anderson et al., U.S. Pat. No. 4,761,373; Haughn et al. (1988) Mol. Gen. Genet. 221:266)؛ و٥-إينوبيروفيل- شيكيمات- فوسفات سنسيز 5-enolpyruvyl-shikimate-phosphate synthase (aroA) (Comai et al. (1985) Nature 317:741)؛ وهالو آريلنيريليز haloarylnitrilase (Stalker et al., published PCT application WO87/04181)؛ واستيل-كوإنزيم A كربوكسيليز acetyl-coenzyme A carboxylase (Parker et al. (1990) Plant Physiol. 92:1220)؛ وداي هيدرو بتيورات سنسيز dihydropteroate synthase (sul I) (Guerineau et al. (1990) Plant Mol. Biol. 15:127)؛ و32 kD

الضوئي II بولي ببتيد (psbA) photosystem II polypeptide (Hirschberg et al. (1983) Science 222:1346).

وأيضاً المشتمل هو عبارة عن جينات تُشفر لمقاومة لـ: الكلورامفينيكول chloramphenicol (Herrera-Estrella et al. (1983) EMBO J. 2:987-992)؛ والميثوتركسات methotrexate (Herrera-Estrella et al. (1983) Nature 303:209-213; Meijer et al. (1991) Plant Mol Bio. 16:807-820 (1991)، وهيجروميسين hygromycin (Waldron et al. (1985) Plant Mol. Biol. 5:103-108; Zhijian et al. (1995) Plant Science 108:219-227; and Meijer et al. (1991) Plant Mol. Bio. 16:807-820)؛ وستربتوميسين streptomycin (Jones et al. (1987) Mol. Gen. Genet. 210:86-91)؛ والسبيكتوميسين spectinomycin (Bretagne-Sagnard et al. (1996) Transgenic Res. 5:131-137)؛ والبليوميسين bleomycin (Hille et al. (1986) Plant Mol. Biol. 7:171-176)؛ والسلفوناميد sulfonamide (Guerineau et al. (1990) Plant Mol. Bio. 15:127-136)؛ والبروموكسونيل bromoxynil (Stalker et al. (1988) Science 242:419-423)؛ و D-٤,٢ (Streber et al. (1989) Bio/Technology 7:811-816)؛ والجليفوسات glyphosate (Shaw et al. (1986) Science 233:478-481)؛ والفسفينوثريسين phosphinothricin (DeBlock et al. (1987) EMBO J. 6:2513-2518).

ولا تعني قائمة الجينات السابقة التي يمكن انتقائها كعلامات والمسجلة أنها قاصرة عليهم. ويتم شمول أي جين يمكن انتقائه أو مسجل بواسطة الاختراع الحالي. ولو من الضروري فمثل هذه الجينات يمكن أن تتوالى بالطرق المعروفة في المجال.

ويتم تخليق جينات العلامات التي يمكن انتقائها أو المسجل لأجل تعبير أقصى في النبات. ولأجل هذا قد تم تعديل تتابع التشفير للجين لتعزيز التعبير في النباتات. ويتم تصميم جين العلامة المخلق ليصبح معبراً عنه في النباتات في مستوى أعلى مؤدياً إلى كفاءة تحويل أعلى. وتعد الطرق متاحة في المجال لأجل تحسين أقصى للجينات المخلقة. وفي الحقيقة قد تم تحسين أقصى للعديد من الجينات لزيادة التعبير لمنتج الجين في النباتات.

قد يتم تحسين تتابع جين العلامة بشكل أقصى للتعبير في أنواع نبات خاصة أو بديلاً عن ذلك قد تكون معدلة للتعبير الأقصى في عائلات النبات. وربما يتم تحديد روامز النبات المفضلة من الروامز ذات التردد العالي في البروتينات المعبر عنها بالكمية الكبرى في أنواع نبات خاصة للفائدة. انظر على سبيل المثال براءة الاختراع الأوروبية رقم ٠٣٥٩٤٧٢؛ ورقم ٠٣٨٥٩٦٢ وبراءة الاختراع الدولية ٩١/١٦٤٣٢ Perlak et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3324-3328; and Murray et al. (1989) Nucleic Acids Research 17: 477-498؛ وبراءة الاختراع الأمريكية رقم ٥,٣٨٠,٨٣١؛ وبراءة الاختراع الأمريكية رقم ٥,٤٣٦,٣٩١. وربما في هذه الطريقة قد يتم تحسين تتابعات النيوكليوتيد بشكل أقصى للتعبير في أي نبات. وقد تم التعرف على أن كل أو أي جزء من تتابع الجين ربما يتم تحسينها بشكل أقصى أو تخليقها. وبهذا أيضاً ربما يمكن استخدام تتابعات محسنة كلياً أو محسنة جزئياً.

الجينات التي تمنح مقاومة لمبيد الأعشاب:

أ. المقاومة/السماحية لحمض أسيتو هيدروكسي سنسيز acetohydroxyacid synthase (AHAS) وأسيتولاكتيت سنسيز (ALS) ضد مبيدات الأعشاب إميدازولينوان imidazolinone أو سلفونيل يوريا sulfonylurea. وقد تم إفشاء الجينات والطفرات لـAHAS والطفرات في براءات الاختراع الأمريكية أرقام ٤,٧٦١,٣٧٣، و٥,٣٠٤,٧٣٢، و٥,٣٣١,١٠٧، و٥,٨٥٣,٩٧٣، و٥,٩٢٨,٩٣٧. وتم إفشاء الجينات والطفرات لـALS في براءات الاختراع الأمريكية أرقام ٥,٠١٣,٦٥٩، و٥,١٤١,٨٧٠.

ب. جينات المقاومة/السماحية لأستيل كوإنزيم A كربوكسيليز (ACCase) ضد مبيدات الأعشاب سيكلوهكسان دايونات و/أو حمض آريلوكسى فينوكسي بروبانويك aryloxyphenoxypropanoic acid (مشتملاً هالوكسيفوب Haloxyfop، ديكلوفوب Diclofop، فينوكسيبروب Fenoxyprop، فلوازيفوب Fluazifop، كوازالوفوب Quizalofop) تم توضيحها في براءات الاختراع أرقام ٥,١٦٢,٦٠٢، و٥,٤٩٨,٥٤٤.

ت. جينات لأجل جليفوسات مقاومة/سماحية. جين لـ ٥-إينوبيروفيل-٣-فوسفوشكيمات سنسيز 5-enolpyruvyl -3-phosphoshikimate synthase (ES3P سنسيز synthase) تم

توضيحه في براءة الاختراع الأمريكية رقم ٥,٧٦٩,٦٠١. وجينات لـ ٥-إينوبيروفيل-٣-فوسفوشكيمات سنسيز 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (ES3PS) والطفرات تم توضيحها في براءات الاختراع الأمريكية أرقام ٤,٩٤٠,٨٣٥، و٥,١٨٨,٦٤٢، و٥,٣١٠,٦٦٧، و٥,٦٣٣,٤٣٥، و٥,٦٣٣,٤٤٨، و٦,٥٦٦,٥٨٧.

ث. جينات لجلوسينات (بايالافوس bialaphos ، فوسفوفينوثريسن phosphinothricin (PPT)) مقاومة/سماحية. جينات لفوسفينوثريسن أستيل ترانسفيراز phosphinothricin acetyltransferase (Pat) تم توضيحها في براءات الاختراع الأمريكية أرقام ٥,٢٧٣,٨٩٤، و٥,٢٧٦,٢٦٨، و٥,٥٥٠,٣١٨؛ وتم توضيح جين لجين المقاومة بايالافوس (Bar) في براءات الاختراع الأمريكية أرقام ٥,٥٦١,٢٣٦، و٥,٦٤٦,٠٢٤، و٥,٦٤٨,٤٧٧، و٧,١١٢,٦٦٥. وتم توضيح جين لجلوتامين سينستاز glutamine synthetase (GS) في براءة الاختراع الأمريكية رقم ٤,٩٧٥,٣٧٢ والتطبيق الأوروبي لبراءة الاختراع أ١ EP٠٣٣٣٠٣٣.

ج. جينات المقاومة/السماحية لهيدروكسي فينيل بيروفات داي أوكسجينز hydroxy phenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) ضد مبيدات الأعشاب ايزوأوكسازول isoxazole، ودايكيتونيتريلز diketonitriles، و/أو ترايكيتونز triketones، و/أو مشتملاً سالكوترايوان sulcotrione وميزوترايوان mesotrione والذي تم توضحيهم في براءات الاختراع الأمريكية أرقام ٦,٢٦٨,٥٤٩، و٦,٠٦٩,١١٥.

ح. جينات لـD-٤،٢ مقاومة/سماحية. وتم توضيح جين D-٤،٢- مونوأوكسيجنيز 2,4-D-monooxygenase في براءة الاختراع الأمريكية رقم ٦,١٠٠,٤٤٦ و٦,١٥٣,٤٠١. وتم إفشاء جينات إضافية لـD-٤،٢ مقاومة/سماحية في براءة الاختراع الأمريكية رقم 2009/0093662، و٢٠٠٧/٠٥٣٤٨٢ براءة الاختراع الدولية.

خ. تم توضيح جين لإميدازول جليسرول فوسفات ديهيداتاز (IGPD) ضد مبيدات الأعشاب إميدازول imidazole و/أو ترايازول triazole في براءة الاختراع الأمريكية رقم ٥,٥٤١,٣١٠. وتم إفشاء الجينات لإنزيمات التفسخ دايكامبا Dicamba degrading enzymes (اوكسجينز

oxygenase، وفيرودوكسين ferredoxin، وريدكتاز reductase) ضد مبيدات الأعشاب دابكامبا herbicide Dicamba في براءات الاختراع أرقام ٧,٠٢٢,٨٩٦، و٧,١٠٥,٧٢٤.

د. جينات لمبيدات الأعشاب التي تثبط التخليق الضوئي، مشتملاً ترايازين triazine (جينات psbA و+1s) أو بينزونيتريل benzonitrile (جين نيتريليز nitrilase gene). انظر مثلاً، Przibila et al., Plant Cell 3:169 (1991) لإفشاء تحول الكلاميدوموناس Chlamydomonas في البلازميدات المشفرة لجينات psbA المطفرة. ويتم الإفشاء لتتابعات النيوكليوتيد لجينات نيتريليز في البراءة الأمريكية رقم ٤,٨١٠,٦٤٨ وتُعد جزيئات الDNA المحتوية على تلك الجينات متاحة تحت ملكية ATCC للأرقام ٥٣٤٣٥، و٦٧٤٤١، و٦٧٤٤٢. ويتم توضيح إنشاء نسائل والتعبير عن تشفير الDNA لجلوتاثايون S- ترانسفيراز glutathione S-transferase بواسطة Hayes et al., Biochem. J. 285:173 (1992).

تمتلك كل التقنيات والمصطلحات المستخدمة هنا نفس المعنى كالمفهوم بشكل واسع من هؤلاء من ذوي المهارة العادية في المجال والتي ينتمي إليها هذا الإفشاء ما أن يتم شرح غير ذلك بصفة خاصة. وقد توجد التعريفات للمصطلحات المشهورة في علم الجزيئات الحيوية molecular biology على سبيل المثال: Lewin, Genes V, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); and Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

يمد الإفشاء بجزيئات حمض نووي مشتملة على تتابع نيوكليوتيد مخلقة والتي ربما توظف كمحفز ثنائي الاتجاه. وربما يكون المحفز ثنائي الاتجاه المخلق في بعض التجسيمات عملياً مرتبط بواحد أو اثنين من تتابعات النيوكليوتيد للفائدة. على سبيل المثال، ربما يكون المحفز ثنائي الاتجاه المخلق عملياً مرتبط بواحد أو اثنين من تتابعات النيوكليوتيد للفائدة (مثل، جينين، واحد عند كل نهاية من المحفز)، وذلك لتنظيم النسخ على الأقل واحدة (مثل، واحدة أو كليهما) من تتابعات النيوكليوتيد للفائدة. ربما يتم تحقيق تعبير خاص وأنماط تنظيمية (مثل، مثل تلك التي يتم عرضها

بواسطة الجينات تحت تحكم محفز الـSCBV) بدمج incorporating الـURS من محفز SCBV في المحفز ثنائي الاتجاه المخلق مع الأخذ في الاعتبار إلى تتابع النيوكليوتيد للفائدة التي تكون عملياً مرتبطة بمحفز ثنائي الاتجاه مخلق.

يتم توضيح بعض التجسيمات للاختراع بالأمثلة هنا بدمج عنصر قلب محفز أدنى من محفز جين يوبيكوتين-1 الأحادي الاتجاه للذرة maize ubiquitin-1 gene (ZmUbi1) إلى سياق جزيئي مختلف عن ذلك المحفز الأصلي لهندسة المحفز الثنائي الاتجاه المخلق. ويشير عنصر قلب محفز أدنى هنا إلى "minUbi1P"، ويساوي تقريباً ٢٠٠ نيوكليوتيد (nt) في الطول. وقد تم التعرف من التوالي والتحليل لعناصر minUbi1P من أنواع الـZea المتعددة والتركيبات الجينية لـZ. mays على أن تكون عناصر minUbi1P الوظيفية عالية الحفاظ، مثل عنصر minUbi1P هذا ربما يحتفظ بوظيفته كبادئ لعملية النسخ لو شارك، على سبيل المثال، على الأقل ما يقرب من ٧٥٪؛ و/أو على الأقل ما يقرب من ٨٠٪؛ و/أو على الأقل ما يقرب من ٩٠٪؛ و/أو على الأقل ما يقرب من ٩١٪؛ و/أو على الأقل ما يقرب من ٩٢٪؛ و/أو على الأقل ما يقرب من ٩٣٪؛ و/أو على الأقل ما يقرب من ٩٤٪؛ و/أو على الأقل ما يقرب من ٩٥٪؛ و/أو على الأقل ما يقرب من ٩٦٪؛ و/أو على الأقل ما يقرب من ٩٧٪؛ و/أو على الأقل ما يقرب من ٩٨٪؛ و/أو على الأقل ما يقرب من ٩٩٪؛ و/أو على الأقل ما يقرب من ١٠٠٪ تعريف تتابع إلى عنصر minUbi1P لـSEQ ID NO:1. وتشمل خصائص عناصر الـminUbi1P التي ربما تكون مفيدة في بعض التجسيمات للاختراع على سبيل المثال وليس الحصر على التتابع عالى الحفاظ من النيوكليوتيد سالف الذكر؛ و/أو وجود على الأقل صندوق TATA واحد؛ و/أو وجود على الأقل واحد (مثلاً، اثنين) من عناصر إجماع الصدمة الحرارية. وبالأخص عناصر minUbi1P، ربما يتم تداخل عناصر إجماع أكثر من صدمة حرارية واحدة خلال تتابع minUbi1P.

ربما تضم في بعض التجسيمات عملية دمج عنصر minUbi1P في سياق جزيئي مختلف عن ذلك المحفز الأصلى لهندسة محفز ثنائي الاتجاه مخلق على دمج عنصر الـ minUbi1Pإلى الحمض النووي لمحفز SCBV، بينما يقوم بعكس اتجاه عنصر الـ minUbi1Pمع الأخذ في الاعتبار راسب التتابع لمحفز SCBV. وبذلك ربما يضم محفز SCBV ثنائي الاتجاه المخلق على

عنصر قلب محفز أدنى للـminUbi1P والواقع على 3′، وفي الاتجاه العكسي مع الأخذ في الاعتبار، لتتابع النيوكليوتيد للمحفز SCBV، مثل ذلك ربما تكون عملياً متصلة بتتابع النيوكليوتيد للفائدة والواقعة على 3′ من تتابع النيوكليوتيد للمحفز SCBV. وعلى سبيل المثال، ربما يتم دمج عنصر الـminUbi1P عند نهاية 3′من المحفز SCBV في الاتجاه العكسي reverse orientation.

ربما يضم أيضاً محفز SCBV الثنائي الاتجاه المخلق على واحد أو أكثر من إضافية للتتابع بالإضافة إلى عنصرminUbi1P وعناصر المحفز SCBV الأصلي. وربما يضم محفز SCBV الثنائي الاتجاه في بعض التجسيمات على محفز URS؛ وإكسون (مثل، إشارة signal أو قائد leader ببتيد peptide)؛ وإنترون؛ وتتابع مباعد spacer sequence؛ و/أو مجموعات من واحد أو أكثر من أي مما سبق. وربما يضم محفز SCBV الثنائي الاتجاه المخلق على سبيل المثال وليس الحصر على تتابع URS من محفز SCBV؛ وإنترون من جين ADH؛ وإكسون يشفر ببتيد قائد من جين Ubi1؛ وإنترون من جين Ubi1؛ ومجموعات من هذا كله.

في بعض تلك الأمثلة المشتملة على محفز SCBV الثنائي الاتجاه المخلق المشتمل على محفز URS، ربما يتم انتقاء الـURS لتمنح خصائص تنظيمية خاصة على المحفز المخلق. وتختلف المحفزات المعروفة بشكل واسع في نوع التحكم التي تبذله على الجينات المرتبطة عملياً (مثل، الاستجابات البيئية environmental responses، والعظة التطورية developmental cues، والمعلومات المكانية spatial information)، ويحافظ الـURS المدمج في محفز غير متجانس heterologous promoter نموذجياً على نوع التحكم الذي يعرضه الـURS مع الأخذ في الاعتبار إلى محفزه الأصلي والجين أو الجينات المرتبطة عملياً. Langridge et al. (1989), supra. وتشكل أمثلة عن محفزات حقيقيات النواة التي قد تم وصفها وربما تحتوي على URS مشتمل خلال محفز Ubi1 ثنائي الاتجاه المخلق وفقاً لبعض التجسيمات على سبيل المثال وليس الحصر: تلك المحفزات الموضحة في براءات الاختراع أرقام ٦,٤٣٧,٢١٧ (محفز RS81 للذرة)؛ و٥,٦٤١,٨٧٦ (محفز أكتين للأرز rice actin promoter)؛ و٦,٤٢٦,٤٤٦ (محفز RS324 للذرة)؛ و٦,٤٢٩,٣٦٢ (محفز PR-1 للذرة)؛ ٦,٢٣٢,٥٢٦ (محفز A3 للذرة)؛ و٦,١٧٧,٦١١ (محفزات بنيوية للذرة constitutive maize promoters)؛ و٦,٤٣٣,٢٥٢ (محفز أوليسين L3

للذرة maize L3 oleosin promoter)؛ ٦,٤٢٩,٣٥٧ (محفز أكتين ٢ rice actin 2 promoter، وإنترون أكتين ٢ للأرز rice actin 2 intron)؛ و٥,٨٣٧,٨٤٨ (محفز خاص بالجذر root-specific promoter)؛ و٦,٢٩٤,٧١٤ (محفزات محرضة للضوء light-inducible promoters)؛ و٦,١٤٠,٠٧٨ (محفزات محرضة للملح salt-inducible promoters)؛ و٦,٢٥٢,١٣٨ (محفزات محرضة للكائنات الممرضة pathogen-inducible promoters)؛ و٦,١٧٥,٠٦٠ (محفزات محرضة لنقص الفوسفور phosphorous deficiency-inducible promoters)؛ و٦,٣٨٨,١٧٠ (محفزات ثنائية الاتجاه)؛ و٦,٦٣٥,٨٠٦ (محفز جاما- كويكسين gamma-coixin promoter)؛ وتطبيق براءة الاختراع الأمريكية رقم مسلسل ٠٩/٧٥٧,٠٨٩ (محفز كلوروبلاست ألدولاز للذرة maize chloroplast aldolase promoter).

وتشمل أمثلة موضحة إضافية لمحفزات بدائيات النواة على محفز إنزيم نوبالين سنسيز nopaline synthase (NOS) (Ebert et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16):5745-9)؛ ومحفز إنزيم أوكتوبين سنسيز octopine synthase (OCS) (الذي يحمل على بلازميدات تحدث أوراماً لأجروباكتيريم تيوميفاشينس (Agrobacterium tumefaciens))؛ ومحفزات كوليموفيروس (caulimovirus) مثل فيروس القرنبيط الفسيفسائي (the cauliflower mosaic virus (CaMV))؛ ومحفز 19S(Lawton et al. (1987) Plant Mol. Biol. 9:315-24)؛ ومحفز 35S CaMV(Odell et al. (1985) Nature 313:810-2)؛ ومحفز فيروس فيجورت الفسيفسائي 35S(Walker et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(19):6624-8)؛ ومحفز سكروز سينيز (Yang and Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144-8)؛ ومحفز معقد الجين R (Chandler et al. (1989) Plant Cell 1:1175-83)؛ وCaMV35S (براءات الاختراع الأمريكية أرقام: ٥,٣٢٢,٩٣٨، و٥,٣٥٢,٦٠٥، و٥,٣٥٩,١٤٢، و٥,٥٣٠,١٩٦)؛ وFMV35S (براءات الاختراع الأمريكية أرقام: ٦,٠٥١,٧٥٣، و٥,٣٧٨,٦١٩)؛ ومحفز PC1SV (براءة الاختراع الأمريكية رقم ٥,٨٥٠,٠١٩)؛ ومحفز SCP1 (براءة الاختراع الأمريكية رقم ٦,٦٧٧,٥٠٣)؛ ومحفزات AGRtu.nos (GenBank Accession No. V00087;

Depicker et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:561-73; Bevan et al. (1983) Nature 304:184-7)، وأمثال ذلك.

ربما يضم محفز الـSCBV ثنائي الاتجاه المخلق أكثر في بعض التجسيمات على إكسون. على سبيل المثال في الأمثلة ربما يكون من المرغوب استهداف أو نقل بولي ببتيد المشفرة بتتابع النيوكليوتيد للفائدة والمرتبطة عملياً بالمحفز لمكان خاص تحت مستوى الخلية و/أو المقسم. في تلك التجسيمات وغيرها، ربما يتم دمج تتابع مشفر (إكسون) إلى جزئ حمض نووي ما بين تتابع المحفز SCBV الثنائي الاتجاه المخلق المتبقي وتتابع نيوكليوتيد مشفر بولي ببتيد. وربما يتم تنظيم تلك العناصر وفقاً إلى حسن التصرف من الممارسين المهرة حيث أنه يعزز المحفز SCBV ثنائي الاتجاه المخلق التعبير للبولي ببتيد (أو واحد أو كل من تتابعى تشفير البولي ببتيد الاثنين التي تعد عملياً متصلة بالمحفز) المشتمل على الببتيد المشفر بواسطة تتابع التشفير المدمجة في علاقة وظيفية مع المتبقي من البولي ببتيد. وفي الأمثلة بالأخص ربما يتم دمج إكسون مشفر لقائد، أو ناقل، أو إشارة ببتيد (مثل، ببتيد Ubi1 قائد).

وتشمل الببتيدات التي ربما يتم تشفيرها بواسطة إكسون المدمج في محفز الـUbi1 ثنائي الاتجاه المخلق، على سبيل المثال وليس الحصر: ببتيد قائد يوبيكويتن (مثل، Ubi1)؛ ببتيد نقل البلاستيدات الخضراء (CTP) (مثل، the A. thaliana EPSPS CTP (Klee et al. (1987) Mol. Gen. Genet. 210:437-42), and the Petunia hybrida EPSPS CTP (della-Cioppa et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6873-7)، كالموضح بالأمثلة لتهديف البلاستيدات الخضراء لإنزيم داي كامبا مونوأوكسيجنيز (DMO) في منشور PCT دولي رقم براءة الاختراع الدولية ٢٠٠٨/١٠٥٨٩٠.

ربما أيضاً يتم دمج الانترونات في محفز SCBV ثنائي الاتجاه المخلق في بعض التجسيمات للاختراع على سبيل المثال ما بين تتابع المحفز SCBV الثنائي المخلق المتبقي وتتابع النيوكليوتيد للفائدة الذي يتم ارتباطه عملياً بالمحفز. في بعض الأمثلة ربما يكون الانترون المدمج intron incorporated في المحفز SCBV ثنائي الاتجاه المخلق وليس الحصر 5′ UTR الذي يعمل كتتابع قائد للترجمة وظيفياً التي توجد في mRNA معالج تماماً عكس الاتجاه لتتابع بدء الترجمة (مثل التتابع القائدة للترجمة translation leader sequence ربما تؤثر على معالجة المنسوخ

المبتدئ primary transcript لـmRNA، و/أو ثبات mRNA، و/أو كفاءة الترجمة (translation efficiency). وتشمل تتابعات قائدة للترجمة على قادة leaders بروتين الذرة maize والبتونيا petunia للصدمة الحرارية (البراءة الأمريكية رقم ٥,٣٦٢,٨٦٥)، وقادة البروتين المغلف لفيروس النبات plant virus coat protein leaders، وقادة نبات روبيسكو plant rubisco leaders، وأخرين. انظر مثلاً Turner and Foster (1995) Molecular Biotech. 3(3):225-36. وتشمل أمثلة غير محدودة لـ5′ UTRs على GmHsp (البراءة الأمريكية رقم ٥,٦٥٩,١٢٢)؛ و PhDnaK (البراءة الأمريكية رقم ٥,٣٦٢,٨٦٥)؛ و AtAnt1؛ TEV (Carrington and Freed (1990) J. Virol. 64:1590-7)؛ و AGRtunos (GenBank Accession No. V00087; and Bevan et al. (1983) Nature 304:184-7). وفي أمثلة بالأخص ربما يتم دمج إنترون Ubi1 و/أو ADH في محفز SCBV ثنائي الاتجاه المخلق.

تشمل تتابعات إضافية والتي ربما تكون تم دمجها اختيارياً إلى محفز SCBV ثنائي الاتجاه المخلق على سبيل المثال وليس الحصر: تتابعات 3′ غير مترجمة؛ مناطق انتهاء النسخ لـ3′؛ ومناطق تذييل بعديد الادينيلات polyadenylation regions. ويوجد عناصر وراثية تقع في الاتجاه السفلي لتتابع النيوكليوتيد للفائدة (مثل، تتابع للفائدة التي تُعد مرتبطة عملياً بمحفز SCBV الثنائي الاتجاه المخلق)، ويشتمل على بولي نيوكليوتيدات التي تمد بإشارة تذييل بالبولي أدينيل، و/أو إشارات تنظيمية أخرى قادرة على التأثير على النسخ، معالجة mRNA، أو التعبير الجيني. وربما توظف إشارة تذييل البولي أدينيل في النباتات لتسبب إضافة نيوكليوتيدات البولي أدينيلات إلى النهاية 3′ من المادة السابقة للـmRNA. وربما يتم اشتقاق تتابع التذييل بالبولي أدينيل من الجين الطبيعي، ومن مختلف جينات النباتات، أو من جينات T-DNA. ويُعد إنزيم نوبالين سينسيز nopaline synthase 3′ region للمنطقة 3′ (nos 3′; Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7) مثال غير محدود لمنطقة نهاية النسخ 3′. ويتم تقديم مثال الاستخدام للمناطق المختلفة الغير مترجمة لـ3′ في Ingelbrecht et al. (1989), Plant Cell 1:671-80. وتشمل أمثلة غير محدودة لإشارات تذييل البولي أدينيلات واحد من جين

(Ps.RbcS2-E9; Coruzzi et al. (1984) EMBO J. Pisum sativum RbcS2 .3:1671-9) and AGRtu.nos (GenBank Accession No. E01312)

يضم محفز SCBV ثنائي الاتجاه المخلق في بعض التجسيمات على واحد أو أكثر من تتابعات النيوكليوتيد التي تشمل تهديف الحمض النووي المشتمل على المحفز إلى مكان مخصص particular locus في الجينوم genome للكائن الحي المستهدف target organism. وربما تشمل واحد أو أكثر من التتابعات على سبيل المثال التي تعد متجانسة إلى أجزاء تتابع الDNA في الجينوم في المضيف (مثل، تتابعات DNA في الجينوم نادرة أو مميزة). وربما ترشد في بعض الأمثلة تلك التتابعات المتجانسة على عملية إعادة الالتئام والتكامل integration للحمض النووي المشتمل على محفز SCBV ثنائي الاتجاه المخلق عند مكان الDNA المتجانس في الجينوم المضيف host genome. يضم المحفز SCBV الثنائي الاتجاه المخلق في أمثلة بالأخص على واحد أو أكثر من تتابعات النيوكليوتيد التي تسهل تهديف الحمض النووي المشتمل على المحفز إلى مكان نادر أو فريد في جينوم المضيف مستخدماً إنزيمات نيوكلييز المهندَسة engineered nuclease enzymes التي تتعرف على التتابع عند مكان نادر أو فريد وتسهل التكامل عند هذا المكان النادر أو الفريد. مثل نظام التكامل المستهدف هذا والذي يقوم بتوظيف إنزيمات زنك-فنجر إندونيوكلييز zinc-finger endonucleases كإنزيم نيوكلييز nuclease enzyme موضح في براءة الاختراع الأمريكية رقم ١٣/٠١١,٧٣٥.

ربما يتم إنتاج الأحماض النووية المشتملة على محفز SCBV الثنائي الاتجاه المخلق باستخدام أي تقنية معروفة في المجال، مشتملة على سبيل المثال وليس الحصر على: RCA، وتضخيم PCR، وتضخيم RT-PCR، وOLA، وSNuPE. وتُعد هذه التقنية والتقنيات المكافئة الأخرى معروفة جيداً لهؤلاء ذوي المهرة في المجال، وتم توضيحها أكثر بالتفصيل على سبيل المثال وليس الحصر: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 2001; and Ausubel et al., Current .Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1998

التوصيل Delivery و/أو التحول transformation: يمد أيضاً الإفشاء الحالي الطرق لأجل تحويل خلية بما تحتويه من جزئ حمض نووي مشتمل على محفز SCBV ثنائي الاتجاه المخلق.

ربما يتم استخدام أي عدد كبير من التقنيات المعروفة في المجال لإدخال جزيئات الحمض النووي إلى النباتات لتحويل النبات بما يحتويه من جزئ الحمض النووي المشتمل على محفز SCBV ثنائي الاتجاه المخلق وفقاً لبعض التجسيمات، فعلى سبيل المثال، لإدخال واحد أو أكثر من محفزات SCBV ثنائية الاتجاه المخلقة إلى جينوم نبات مضيف، و/أو لإدخال أكثر واحد أو أكثر من جزئ أو جزيئات الحمض النووي للفائدة والتي عملياً مرتبطة بالمحفز.

تشمل طرق مناسبة لتحويل النباتات على أي طريقة بها قد يتم إدخال الDNA إلى الخلية، على سبيل المثال وليس الحصر: عملية كهربية electroporation (انظر على سبيل المثال براءة الاختراع رقم ٥,٣٨٤,٢٥٣)؛ وقصف مقذوف مجهري microprojectile bombardment (انظر على سبيل المثال براءات الاختراع الأمريكية رقم ٥,٠١٥,٥٨٠، و٥,٥٥٠,٣١٨، و٥,٥٣٨,٨٨٠، و٦,١٦٠,٢٠٨، و٦,٣٩٩,٨٦١، و٦,٣٨٤,٣٠١)؛ وتحويل بوساطة الأجروباكتيريم Agrobacterium-mediated transformation (انظر على سبيل المثال براءات الاختراع رقم ٥,٦٣٥,٠٥٥، و٥,٨٢٤,٨٧٧، و٥,٥٩١,٦١٦، و٥,٩٨١,٨٤٠، و٦,٣٨٤,٣٠١)؛ وتحويل البروتوبلاست protoplast transformation (انظر على سبيل المثال براءة الاختراع الأمريكية رقم ٥,٥٠٨,١٨٤). وخلال تطبيق التقنيات مثل السالف ذكره، فإنه يتم تحويل الخلايا من أنواع النباتات الافتراضية، ومثل هذه الخلايا ربما يتم تطويرها إلى نباتات متحورة وراثياً بواسطة تقنيات معروفة إلى هؤلاء من ذوي المهارة في المجال. على سبيل المثال التقنيات التي ربما تكون مفيدة بالأخص في سياق تحول القطن context of cotton الموصوف في براءة الاختراع الأمريكية رقم ٥,٨٤٦,٧٩٧، و٥,١٥٩,١٣٥، و٥,٠٠٤,٨٦٣، و٦,٦٢٤,٣٤٤؛ والتقنيات لتحول نباتات البراسسكا Brassica plants بالأخص والموصوفة على سبيل المثال في براءة الاختراع الأمريكية رقم ٥,٧٥٠,٨٧١؛ والتقنيات لتحول نبات الصويا transforming soya كالموضح على سبيل المثال براءة الاختراع الأمريكية رقم ٦,٣٨٤,٣٠١؛ والتقنيات لأجل تحول الذرة كالموضحة على سبيل المثال في براءات الاختراع الأمريكية رقم ٧,٠٦٠,٨٧٦، و٥,٥٩١,٦١٦، ومنشور PCT دولي رقم براءة الاختراع الدولية ٩٥/٠٦٧٢٢.

بعد تأثير توصيل حمض نووي خارجي إلى خلية مستقبلة recipient cell، فإنه يتم التعرف على بصفة عامة الخلية المتحولة transformed cell من أجل زرع culturing وتوليد أكثر للنبات

plant regeneration. ولكي يحسن من القدرة على التعرف على المتحولين، فإنه ربما يرغب أحدانا لتوظيف جين ذو علامة من الممكن انتقائه أو فحصه مع ناقل التحول المستخدم لتوليد المتحول transformant. في هذه الحالة يمكن معايرة التكتل الخلوي المتحول transformed cell population فعلياً بتعرض الخلايا إلى عامل agent أو عوامل agents منتقاه selective، أو قد يتم فحص الخلايا لجين الصفة المرغوبة ذي العلامة.

ربما يتم زرع الخلايا التي تنجو من التعرض لعامل الانتقائية، أو الخلايا التي تم وسجلت إيجابية في تجربة الفحص في الوسط الذي تدعم توليد النباتات. في بعض التجسيمات ربما يتم تعديل أي وسط زرع culture media ملائم لنسيج النبات plant tissue (مثل، MS ووسط N6) بأن يشمل على مواد أكثر مثل منظمات النمو growth regulators. ربما يتم الحفاظ على النسيج على وسط قاعدي basic media مع منظمي النمو حتى يكون هناك نسيج كاف متاح لبدء جهود توليد النبات، أو الجولات المتكررة المتتابعة للاختيار اليدوي manual selection حتى يكون شكل morphology النسيج مناسب للتوليد (مثل، على الأقل أسبوعين)، ثم يتم النقل إلى وسط توصيل لتكوين النبتة shoot formation. يتم نقل الزروع Cultures دورياً حتى يحدث تكوين كافي للنبتة. ما أن تتكون النبتات فإنه يتم نقلهم إلى وسط موصل لتكوين النبتة. وما أن تكونت الجذور الكافية قد يتم نقل النباتات إلى التربة soil لنمو ونضج maturity أكثر.

ربما يتم إجراء تجارب متعددة للتأكد من وجود جزئ الحمض النووي المرغوب المشتمل على محفز SCBV المُخلّق ثنائي الاتجاه في النباتات المتولدة. وتشمل مثل هذه التجارب على سبيل المثال: التجارب الحيوية الجزيئية molecular biological assays مثل بقعة نورثرن وويسترن و PCR؛ وتجارب بيوكيميائية biochemical assays مثل استكشاف وجود منتج بروتيني protein product، على سبيل المثال بوسائل مناعية immunological means (ELISA و/أو بقعة ويسترن الجنوبي Western blots) أو بوظيفة إنزيمية enzymatic function؛ وتجارب أجزاء النبات plant part assays؛ مثل تجارب الورقة leaf أو الجذر root؛ وتحليل النمط الظاهري phenotype للنبات الكُلي المتولد whole regenerated plant.

يمكن فحص حالات التكامل المستهدفة، على سبيل المثال، بواسطة تضخيم PCR باستخدام، على سبيل المثال، بوادئ أوليجونيوكليوتيد oligonucleotide primers محددة لجزيئات حمض نووي

محل الاهتمام. من المفهوم أن التنميط الجيني لـ PCR يتضمن، وليس على سبيل الحصر، تفاعل تضخيم سلسلة بوليميراز polymerase-chain reaction (PCR) لجينومي DNA مشتقة من نسيج خلية من النبات المضيف المفصول من المتوقع أن يتضمن جزيء حمض نووي محل الاهتمام متكامل داخل الجينوم، يلي ذلك نسخ عياري standard cloning وتحليل تتابع منتجات تضخيم PCR. تم وصف طرق التنميط الجيني لـ PCR جيداً (انظر، على سبيل المثال، Rios et al. (2002), Plant J. 32:243-53)، وقد تنطبق على جينومي DNA مشتقة من أي أنواع نباتات أو نوع نسيج، بما في ذلك استنبات الخلايا. يمكن استخدام توليفات من بوادئ أوليجونيوكليوتيد oligonucleotide primers التي ترتبط بكلاً من تتابع الهدف والتتابع الداخل تتابعياً أو بشكل متعدد التضفير في تفاعلات تضخيم PCR amplification reactions. يمكن إنتاج بوادئ الأوليجونيوكليوتيد المصممة لتتصلب في الموقع المستهدف، تتابعات حمض نووي الداخلة، و/أو توليفات من اثنين منها. بالتالي، قد تشتمل استراتيجيات التنميط الجيني لـ PCR على، على سبيل المثال وبدون حصر: تضخيم تتابعات معينة في جينوم النبات plant genome؛ تضخيم تتابعات متعددة معينة في جينوم النبات؛ تضخيم تتابعات غير معينة في جينوم النبات؛ وتوليفات من أي مما سبق. قد يحدد أحد المهرة في الفن توليفات إضافية من بوادئ وتفاعلات تضخيم لفحص الجينوم. على سبيل المثال، يمكن تصميم مجموعة من بوادئ أوليجونيوكليوتيد التقدمية forward والعكسية reverse لتتصلب إلى تتابع (تتابعات) حمض نووي محددة للهدف خارج حدود boundaries تتابع الحمض النووي المقدم.

يمكن تصميم بوادئ أوليجونيوكليوتيد تقدمية وعكسية لتتصلب بشكل خاص بجزيء حمض نيوكليوتيد مقدم، على سبيل المثال، عند تتابع يقابل نطاق تشفير داخل تتابع نيوكليوتيد محل الاهتمام متضمن به، أو أجزاء أخرى من جزيء الحمض النووي. يمكن استخدام تلك البوادئ primers بالترافق مع البوادئ الموصوفة أعلاه. يمكن تخليق بوادئ الأوليجونيوكليوتيد وفقاً لتتابع مرغوب فيه، وتكون متاحة تجارياً (على سبيل المثال، من Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA). يمكن نسخ التضخيم بعد ذلك وتسلسله، أو بواسطة منتجات تضخيم تحليل تتابع مباشر. قد يتصور أحد المهرة في الفن طرق بديلة لتحليل منتجات التضخيم المتولدة

أثناء التنميط الجيني لـ PCR. في أحد التجسيمات، يمكن استخدام بوادئ أوليجونيوكليوتيد محددة لهدف الجين في تضخيمات PCR amplifications.

تنص بعض التجسيمات الخاصة بالاختراع الحالي أيضاً على خلايا يتضمن معزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي، على سبيل المثال، كما قد يوجد في جزء منشأ حمض نووي. في أمثلة خاصة، يمكن استخدام معزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي وفقاً لبعض التجسيمات كتتابع تنظيمى لتنظيم التعبير الجيني عن خلايا نبات ونباتات محورة وراثياً. في بعض من تلك الأمثلة، قد يؤدي استخدام معزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي متصل بشكل عملى بتتابع نيوكليوتيد محل الاهتمام (على سبيل المثال، طفرة وراثية) إلى خفض عدد المعززات المتطابقة المطلوبة لتنظيم التعبير الجيني عن عدد معطى من تتابعات نيوكليوتيد محل الاهتمام، و/أو خفض حجم جزء (أجزاء) منشأ للحمض النووي مطلوبة لإدخال عدد معطى من تتابعات نيوكليوتيد محل الاهتمام. علاوة على ذلك، قد يسمح استخدام معزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي بالتعبير المشترك عن تتابعى نيوكليوتيد متصلين بشكل عملى محل الاهتمام فى نفس الظروف (أي، الظروف التي تحتها يتم تنشيط المعزز SCBV). قد تكون تلك الأمثلة مفيدة بشكل خاص، على سبيل المثال، عندما يساهم كلا تتابعى النيوكليوتيد متصلين بشكل عملى محل الاهتمام إلى صفة واحدة في مضيف معدل وراثياً يتضمن تتابعات النيوكليوتيد محل الاهتمام، والتعبير الجيني المشترك عن تتابعات النيوكليوتيد محل الاهتمام الآثار المفيدة للتعبير الجيني عن الصفة في المضيف المعدل وراثياً transgenic host.

في بعض التجسيمات، قد يكون لنبات معدّل وراثياً يتضمن واحد أو أكثر من معزز (معززات) SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي و/أو تتابع (تتابعات) نيوكليوتيد محل الاهتمام به واحدة أو أكثر من الصفات المرغوب فيها ممنوحة (على سبيل المثال، متقدمة introduced، معززة enhanced، أو مساهمة contributed في) عن طريق التعبير (التعبيرات) الوراثي عن تتابع النيوكليوتيد محل الاهتمام في النبات. قد تشتمل تلك الصفات على، على سبيل المثال لا الحصر: مقاومة الحشرات، الآفات pests الأخرى، وعوامل مسببة للمرض disease-causing agents؛ التحمل لمبيدات الأعشاب herbicides، وتعزيز الاستقرار enhanced stability، والغلة yield، أو العمر الافتراضي shelf-life؛ التحمل البيئي environmental tolerances، وإنتاج الأدوية

pharmaceutical production؛ الإنتاج الصناعي industrial product production، والتحسينات الغذائية nutritional enhancements. في بعض الأمثلة، يمكن منح سمة مرغوب فيها بواسطة تحول نبات باستخدام جزيء حمض نووي يتضمن معزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي متصل بشكل عملي بتتابع نيوكليوتيد محل الاهتمام. في بعض الأمثلة، يمكن منح سمة مرغوب فيها إلى نبات منتج في صورة نبات سلالة progeny plant عن طريق التربية breeding، حيث يمكن منح تلك الصفة بواسطة واحد أو أكثر من تتابعات نيوكليوتيد محل الاهتمام متصل بشكل عملي بمعزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي الذي/التي تمر إلى النبات من النبات الأصلي الذي يتضمن تتابع نيوكليوتيد محل الاهتمام متصل بشكل عملي بمعزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي.

قد يكون أي نبات معدّل وراثياً وفقاً لبعض التجسيمات عبارة عن أي نبات قد يكون محول باستخدام جزيء حمض نووي للاختراع، أو تكون مولدة باستخدام نبات محول باستخدام جزيء حمض نووي للاختراع. وفقاً لذلك، قد يكون النبات ثنائي أو أحادي الفلقة. تشتمل الأمثلة غير المقيدة للنباتات ثنائية الفلقة للاستخدام في بعض الأمثلة على: البرسيم alfalfa؛ الفول beans؛ القرنبيط، الملفوف، زيت الكانولا، والجزر، القرنبيط، الكرفس، الملفوف الصيني، القطن؛ الخيار؛ الباذنجان؛ الخس؛ البطيخ؛ البازلاء، الفلفل، الفول السوداني، البطاطا، اليقطين، الفجل، اللفت، السبانخ، فول الصويا، الكوسة، بنجر السكر؛ عباد الشمس؛ التبغ؛ الطماطم؛ والبطيخ. تشتمل الأمثلة غير المقيدة للنباتات أحادية الفلقة للاستخدام في بعض الأمثلة على: الذرة؛ البصل، والأرز، الذرة، القمح، الجاودار، الدخن، قصب السكر، الشوفان oat، التريتيكال triticale، التبن switchgrass، والمروج turfgrass.

في بعض التجسيمات، يمكن استخدام أو زراعة نبات معدّل وراثياً بأي طريقة، حيث يكون من المرغوب فيه وجود معزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي و/أو تتابع نيوكليوتيد متصلة عملياً محل الاهتمام. وفقاً لذلك، يمكن تعديل تلك النباتات المعدلة وراثياً هندسياً، في مجمل الأمور، ليكون بها واحدة أو أكثر من الصفات المرغوب فيها، من خلال تحويلها باستخدام جزيئات حمض نووي وفقاً للاختراع، ويمكن اقتصاصها و/أو زراعتها بواسطة أي طريقة معروفة لأولئك المهرة في الفن.

في حين تم وصف الاختراع بالإشارة إلى الطرق والتجسيمات الخاصة، فإنه سوف يتم إدراك أنه يمكن إجراء التعديلات والتغيرات المختلفة بدون الحيود عن مجال الاختراع.

تم تقديم الأمثلة التالية لتوضيح السمات و/أو التجسيمات الخاصة. يجب عدم اعتبار الأمثلة مقيدة للكشف بالسمات المحددة أو التجسيمات النموذجية.

٥ الأمثلة

المثال ١: التمحور والتعبير الجيني

تحول الأجرعية المورمة Agrobacterium tumefaciens: يتم تحويل ناقل pDAB108706 ثنائي إلى الأجرعية المورمة صبغة DAt13192 ثلاثي (براءة اختراع أمريكية مؤقتة رقم ٦١/٣٦٨٩٦٥). تم فصل مستعمرات بكتيرية Bacterial colonies وبلازميد ثنائي binary ١٠ DNA plasmid وتأكيدها عن طريق تصميم إنزيم تقييد restriction enzyme.

تحويل الذرة Corn Transformation: تعقيم السنبلة Ear Sterilization وفصل الأجنة Embryo Isolation. للحصول على أجنة ذرة غير ناضجة immature embryos، تم إنماء نباتات من Zea mays (c.v. B104) في الصوبة greenhouse وتلقيح ذاتي أو أشقائي self or sib-pollinated لإنتاج السنبلة. تم تجميع السنابل ears تقريباً ٩-١٢ يوم بعد التلقيح ١٥ post-pollination. في يوم التجربة، يتم تعقيم سطح السنابل عن طريق الغمر immersion في محلول ٢٠٪ من مبيّض صوبة household bleach، حيث يحتوي على ٥٪ صوديوم هيبوكلوريت sodium hypochlorite، والهز shaken لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة، يلي ذلك ثلاث شطفات rinses في ماء معقم sterile water. بعد التعقيم sterilization، تم تشريح الأجنة الملقحة غير الناضجة immature zygotic embryos (١.٥-٢.٢ مم) في جو معقم من كل ٢٠ سنبلة ear وتوزيعها بشكل عشوائي في أنابيب طرد مركزي دقيقة micro-centrifuge tubes تتضمن وسط إصابة سائل liquid infection media (وسط LS Basal، ٤.٤٣ جم/لتر؛ محلول فيتامين N6 Vitamin Solution [X١٠٠٠]، ١.٠٠٠ مل/لتر؛ L- برولين L-proline، ٧٠٠.٠ مجم/لتر؛ سكروز sucrose، ٦٨.٥ جم/لتر؛ جلوكوز glucose، ٣٦.٠ جم/لتر؛ ٢،

٤- أيام، ١.٥٠ مجم/لتر. بالنسبة لمجموعة معطاة من التجارب، وسحب pooled الأجنة embryos من ٢-٣ سنابل تم استخدام لكل معالجة treatment.

بداية استنبات الأجرعية Agrobacterium Culture Initiation: يتم تخطيط جليسرول Glycerol من الأجرعية Agrobacterium تتضمن النواقل الثنائية binary vectors الموصوفة أعلاه على أطباق plates أدنى وسط AB تتضمن مضادات حيوية antibiotics ملائمة وتم إنماءها عند ٢٠ درجة مئوية لمدة ٣-٤ أيام. تم التقاط مستعمرة colony واحدة ووضعها على أطباق YEP تتضمن نفس المضادات الحيوية وتم احتضانها عند ٢٨ درجة مئوية لمدة ١-٢ يوم.

تم أخذ استنبات الأجرعية والاستنبات المشترك Co-cultivation: في يوم التجربة، المستعمرات الأجرعية من طبق YEP، معلق suspended في ١٠ مل من وسط إصابة infection medium في أنبوب tube يمكن التخلص منه سعة ٥٠ مل، وتم تعديل كثافة الخلية cell density إلى OD600 = ٠.٢-٠.٤ نانومتر باستخدام مقياس طيف ضوئي spectrophotometer. تم وضع استنباتات الأجرعية على هزاز دوار rotary shaker بمعدل ١٠٠ لفة بالدقيقة، درجة حرارة الغرفة، أثناء تشريح الجنين embryo dissection. تم فصل الأجنة الملقحة غير الناضجة Immature zygotic embryos بين ١.٥-٢.٢ مم في الحجم من حبات الذرة maize kernels المعقمة sterilized ووضعها في ١ مل من وسط الإصابة وغسلها مرة واحدة في نفس الوسط. تمت إضافة معلق الأجرعية Agrobacterium suspension (٢ مل) إلى كل أنبوب وتم قلب الأنابيب حوالي ٢٠ مرة ثم هزها لمدة ١٠-١٥ دقيقة. تم نقل الأجنة على وسط الاستنبات المشترك co-cultivation media (أملاح MS، ٤.٣٣ جم/لتر؛ L- بروليين، ٧٠٠٠٠ مجم/لتر؛ إنوسيتول عضلي myo-inositol، ١٠٠٠٠ مجم/لتر؛ تحلل مائي لكازين إنزيمي casein enzymatic hydrolysate ١٠٠٠٠ مجم/لتر؛ ديكامبا Dicamba - ٣.٣٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٣٠٠٠ جم/لتر؛ Gelzan™، ٣.٠٠ جم/لتر؛ ڤيتامين- MS معدّل [X١٠٠٠]، ١.٠٠٠ مل/لتر، AgNo3، ١٥.٠ مجم/لتر؛ أسيتو سيرينجون Acetosyringone، ١٠٠ ميكرومولار)، موجه باستخدام قصيغة scutellum موجهة لأعلى، والاحتضان لمدة ٣-٤ أيام في الضوء light عند ٢٥ درجة مئوية.

يمكن ملاحظة GUS والتعبير الجيني العابر YFP/PhiYFP Transient expression: PhiYFP/Transient YFP والتعبير عن GUS في الأجنة المحولة embryos transformed وبعد ٣ أيام من الاستنبات المشترك باستخدام الأجرعية. تمت ملاحظة الأجنة تحت ميكروسكوب مجسم (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL) باستخدام مرشح YFP filter ومصدر ضوء light source ٥٠٠ نانومتر. يتم اختيار الأجنة التي تعرض التعبير الجيني عن PhiYFP/YFP لتجربة نسيجية GUS. يتم تحضير محلول تلطيخ GUS staining solution كما هو موصوف في Maniatis et al. (1989) ويتم احتضان الأجنة في ١ مل من محلول لمدة ٢٤ ساعة عند ٣٧ درجة مئوية. تمت ملاحظة الأجنة للتعبير الجيني GUS العابر تحت المجهر microscope.

اختيار وإعادة توليد نسيج لين Callus من حالات مفترضة: بعد فترة الاستنبات المشترك co-cultivation period، تم نقل الأجنة إلى وسط استقرار resting media (أملاح MS، ٤.٣٣ جم/لتر؛ L- بروليين، ٧٠٠٠٠ مجم/لتر؛ إنوسيتول عضلي، ١٠٠٠٠ مجم/لتر؛ MES [(حمض ٢-(n-مورفولينو)- إيثان سلفونيك 2-(n-morpholino)-ethanesulfonic acid]، حمض حر free acid] ٥٠٠٠٠ مجم/لتر؛ تحلل مائي لكازين إنزيمي ١٠٠٠٠ مجم/لتر؛ ديكامبا، ٣.٣٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٣٠٠٠ جم/لتر؛ Gelzan ٢.٣٠ جم/لتر؛ ڤيتامين- MS معدّل [X١٠٠٠]، ١.٠٠٠ مل/لتر؛ AgNo3، ١٥.٠ مجم/لتر؛ كاربينيسيلين Carbenicillin، ٢٥٠٠٠ مجم/لتر) بدون عامل انتقائي والاحتضان في الضوء لمدة ٧ أيام عند ٢٨ درجة مئوية. تم نقل الأجنة على وسط اختيار ١ (أملاح MS، ٤.٣٣ جم/لتر؛ L- بروليين، ٧٠٠٠٠ مجم/لتر؛ إنوسيتول عضلي، ١٠٠٠٠ مجم/لتر؛ MES [(حمض ٢-(n- مورفولينو)- إيثان سلفونيك)، حمض حر] ٥٠٠٠٠ مجم/لتر؛ تحلل مائي لكازين إنزيمي ١٠٠٠٠ مجم/لتر؛ ديكامبا، ٣.٣٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٣٠٠٠ جم/لتر؛ Gelzan™ ٢.٣٠ جم/لتر؛ ڤيتامين- MS معدّل [X١٠٠٠]، ١.٠٠٠ مل/لتر؛ AgNo3، ١٥.٠ مجم/لتر؛ كاربينيسيلين، ٢٥٠٠٠ مجم/لتر) تتضمن ١٠٠ نانومتر هالوكسيفوب والاحتضان في ٢٤ ساعة ضوء بكثافة ضوء light intensity ٥٠ ميكرومول دقيقة-٢.ثانية-١ لمدة ٧ أيام عند ٢٨ درجة مئوية.

تم نقل الأجنة ذات كالس تخلقي تكاثري proliferating embryogenic calli على وسط اختيار ٢ (أملاح MS، ٤.٣٣ جم/لتر؛ إنوسيتول عضلي، ١٠٠.٠ مجم/لتر؛ L- برولين، ٧٠٠.٠ مجم/لتر؛ MES [(حمض ٢-(n- مورفولينو)- إيثان سلفونيك)، حمض حر] ٥٠٠.٠ مجم/لتر؛ تحلل مائي لكازين إنزيمي ١٠٠.٠ مجم/لتر؛ ديكامبا، ٣.٣٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٣٠.٠ جم/لتر؛ Gelzan™ ٢.٣٠ جم/لتر؛ ڤيتامين- MS معدّل [X١٠٠٠]، ١.٠٠ مل/لتر؛ AgNo3، ١٥.٠ مجم/لتر؛ كاربينيسيلين، ٢٥٠.٠ مجم/لتر) تتضمن ٥٠٠ نانومتر هالوكسيفوب واحتضانها في ٢٤ ساعة ضوء بكثافة ضوء ٥٠ ميكرومول دقيقة-٢.ثانية-١ لمدة أخرى ١٤ أيام عند ٢٨ درجة مئوية. تسمح خطوة الاختيار هذه للنسيج اللين المعدل وراثياً بتكاثر وتمايز إضافي. يستغرق اختيار النسيج اللين مدة ثلاث أسابيع. تم نقل كالس تخلقي تكاثري على وسط إعادة توليد ١ (أملاح MS، ٤.٣٣ جم/لتر؛ إنوسيتول عضلي، ١٠٠.٠ مجم/لتر؛ L- برولين، ٣٥٠.٠ مجم/لتر؛ MES [(حمض ٢-(n- مورفولينو)- إيثان سلفونيك)، حمض حر] ٢٥٠.٠ مجم/لتر؛ تحلل مائي لكازين إنزيمي ٥٠٠.٠ مجم/لتر؛ NAA ٠.٥٠٠ مجم/لتر؛ ABA ٢.٥٠ مجم/لتر؛ BA ١.٠٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٤٥.٠ جم/لتر؛ Gelzan™ ٢.٥٠ جم/لتر؛ ڤيتامين-MS معدّل [X١٠٠٠]، ١.٠٠ مل/لتر؛ AgNo3، ١.٠٠ مجم/لتر؛ كاربينيسيلين، ٢٥٠.٠ مجم/لتر) تتضمن ٥٠٠ نانومتر هالوكسيفوب والاستنبات في ٢٤ ساعة ضوء بكثافة ضوء ٥٠ ميكرومول دقيقة-٢.ثانية-١ لمدة ٧ أيام عند ٢٨ درجة مئوية. تم نقل كالس تخلقي مع براعم شبيه الفسيلة على وسط إعادة توليد ٢ (أملاح MS، ٤.٣٣ جم/لتر؛ ڤيتامين- MS معدّل [X١٠٠٠]، ١.٠٠ مل/لتر؛ إنوسيتول عضلي، ١٠٠.٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٦٠.٠ جم/لتر؛ Gellan Gum G434™ ٣.٠٠ جم/لتر؛ كاربينيسيلين، ٢٥٠.٠ مجم/لتر) تتضمن ٥٠٠ نانومتر هالوكسيفوب haloxyfop. تم احتضان الاستنبات تحت الضوء لمدة ٢٤ ساعة بكثافة ضوء ٥٠ ميكرومول دقيقة-٢.ثانية-١ لمدة ٧-١٠ أيام عند ٢٨ درجة مئوية. تم نقل الفسائل shoots الصغيرة بجذور أساسية لإطالة الفسيلة shoot ووسط تجذيري rooting media (أملاح MS، ٤.٣٣ جم/لتر؛ ڤيتامين- MS معدّل [X١٠٠٠]، ١.٠٠ مل/لتر؛ إنوسيتول عضلي، ١٠٠.٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٦٠.٠ جم/لتر؛ Gellan Gum G434™ ٣.٠٠ جم/لتر؛ كاربينيسيلين، ٢٥٠.٠ مجم/لتر) في صناديق MAGENTA™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)، واحتضانها تحت ٨/١٦

ساعات ضوء/ظلام لمدة ٧ أيام عند ٢٨ درجة مئوية. تم تحليل الشتلات المعدلة وراثياً المفترضة لتحديد عدد النسخ المعدلة وراثياً ونقلها إلى الصوبة greenhouse.

المثال ٢: تكوين معزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي وناقل pDAB108708

تم عرض رسم تخطيطي نموذجي لمعزز Ubiquitin-1 للذرة (Ubi1) في الشكل ١. تم نسخ معزز Ubi1 من الذرة. تم تضمين PCR لبلازميد تتضمن المعزز باستخدام نظام تضخيم PCR عالي الدقة. تم تعريف تقريباً ٢٠٠ منطقة نيوكليوتيد من معزز ذرة Ubi1 في صورة معزز أدنى لب Zea mays Ubi1 (minUbi1P) (هوية تتابع رقم: ١). بعد ذلك تمت إضافة minUbi1P بهوية تتابع رقم: ١ إلى بولي نيوكليوتيد يتضمن إكسون Zea mays Ubiquitin-1 (إكسون ZmUbi1) وإنترون Zea mays Ubiquitin-1 (إنترون ZmUbi1) باستخدام طرق نسخ معروفة بشكل شائع في الفن لإنتاج عديد النيوكليوتيد بهوية تتابع رقم: ٢. بعد ذلك تم نسخ عديد النيوكليوتيد عكس الاتجاه الناتج في اتجاه عكسي لحمض نووي يتضمن معزز الذرة Ubi1 (بما في ذلك Ubi1 URS) لإنتاج معزز Ubi1 ثنائي الاتجاه التخليقي بهوية تتابع رقم: ٣.

تم نسخ تتابعات تشفير جين مراسل بعد كل نهاية من معزز Ubi1 ثنائي الاتجاه التخليقي. تم إدخال تتابع تشفير بروتين تفلور أصفر yellow fluorescence protein (YFP) بعد شظية عديدة النيوكليوتيد حيث تتضمن عناصر معزز minUbi1P، إكسون ZmUbi1، وإنترون ZmUbi1. بالإضافة لذلك، تتابع قائد تالي يتضمن تتابع توقف عديدة النيوكليوتيد ذات ٣ إطارات وتم إضافة تتابع عديد النيوكليوتيد يتوافق مع الذرة إلى شظية عناصر معزز minUbi1P، إكسون ZmUbi1، وإنترون ZmUbi1. تم إدخال تتابع تشفير uidA (GUS) أيضاً بعد معزز Ubi1 ثنائي الاتجاه التخليقي في اتجاه عكسي بالنسبة لتتابع YFP لإنتاج الحمض النووي بهوية تتابع رقم: ٤. يتم نسخ عديد النيوكليوتيد الناتج يتضمن معزز Ubi1 ثنائي الاتجاه التخليقي متصل بشكل عملى بجينات YFP وGUS إلى بلازميد pDAB105801. يوضح الشكل ٤ اتجاه مجموعة التعبير الجيني عن YFP وGUS بالنسبة لمعزز Ubi1 ثنائي الاتجاه التخليقي في بلازميد pDAB105801.

تمت إزالة معزز تتابع Ubi1 الأصلي من معزز Ubi1 ثنائي الاتجاه من بلازميد pDAB105801 واستبداله باستخدام شظية PCR مضخمة تتضمن معزز SCBV وإنترون ADH (هوية تتابع رقم: ٦). تم ذكر معزز SCBV ثنائي الاتجاه التخليقي النموذجي الناتج في صورة هوية تتابع رقم: ٥ (انظر أيضاً الشكل ٥). تؤدي إضافة معزز SCBV هذا إلى اكتمال ناقل pDAB105806 (الشكل ٦). ذلك الناقل المتضمن في مجموعات التعبير الجيني عن جين YFP وGUS حيث تكون متحركة بواسطة معزز SCBV ثنائي الاتجاه (هوية تتابع رقم: ٧؛ انظر أيضاً الشكل ٧).

تم استكمال الناقل الثنائي الذي يتضمن مجموعات التعبير الجيني عن الجين GUS وYFP من بلازميد pDAB105806 عن طريق تفاعل GATEWAY L-R CLONASE (Invitrogen, Carlsbad, CA). الناقل الناتج، pDAB108708، محتواة في مجموعات التعبير الجيني عن الجين GUS، YFP، و AAD-1 داخل منطقة سلالة T (انظر الشكل ٩).

المثال ٣: التعبير الجيني عن جينات متصل بشكل عملى بمعزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي

يمكن تصوير الأمثلة النموذجية للتعبير الجيني العابر عن YFP وGUS في أجنة Zea mays محولة باستخدام pDAB108708. قد يحرّك كلا جانبي معزز SCBV ثنائي الاتجاه التعبير الجيني القوي عن تتابعات تشفير YFP وGUS المرتبطة عملياً. يكون التعبير الجيني عن مستويات YFP مقارناً بالتعبير عن مستويات GUS. تؤكد تلك الملاحظات أن كلاً من جانبي معزز SCBV ثنائي الاتجاه تكون بوظيفة بيولوجية. علاوة على ذلك، قد يعبر عنصر minUbi1P لمعزز SCBV ثنائي الاتجاه التخليقي عن YFP عند مستويات تعبير مشابه مقارنةً بنسيج Zea mays لين محول باستخدام بلازميد ثنائي (pDAB101556) التي تتضمن فقط معزز ZmUbi1 ثنائي الاتجاه لتتابع تشفير YFP. لا يتم كشف التعبير الجيني عن YFP أو GUS في أجنة غير ناضجة مقارنة سالبة التي لا تكون محولة باستخدام بنية ثنائية binary construct، ولا تحتوي على تتابعات تشفير YFP أو GUS.

المثال ٤: التعبير الجيني المستقر عن جينات متصل بشكل عملى بمعزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي

يمكن ملاحظة صور خلايا نسيج Zea mays لين والتي تكون مستقرة محولة باستخدام ناقل pDAB108708 ثنائي، حيث يحتوي على تتابع تشفير YFP. تم الحصول على تلك الخلايا من أجنة Z. mays التي تم نشرها على وسط اختيار ٢. تم استخدام ظروف وبروتوكول المجهر التي تم استخدامها لتوليد صور الأجنة. قد يحرّك معزز SCBV ثنائي الاتجاه التعبير الجيني القوي عن تتابعات تشفير YFP. تؤكد تلك النتائج أن عنصر أدنى معزز Min-Ubi1P من معزز SCBV ثنائي الاتجاه يكون قادراً على التعبير عن جين مبلّغ في خلايا نسيج Z. mays لين محولة بشكل مستقر. تكون مستويات التعبير الجيني عن بروتين YFP متشابهة مقارنةً بالتعبير عن YFP في نسيج Z. mays اللين المحول باستخدام ناقل ثنائي مقارن يحتوي على معزز ZmUbi1 موحد الاتجاه تتابع تشفير YFP (pDAB101556). لا يتم كشف التعبير الجيني عن YFP في النسيج اللين المقارن السالب الذي لا يكون محولاً باستخدام بنية ثنائية ولا يحتوي على تتابع تشفير YFP أو GUS.

المثال ٥: تقدير عدد النسخ المعدلة وراثياً باستخدام Real Time TaqMan™ PCR

تم تحويل أجنة Zea mays باستخدام ناقل ثنائي يتضمن معزز SCBV ثنائي الاتجاه، pDAB108708، وتم تحويل نباتات أخرى باستخدام ناقل ثنائي مقارن، pDAB101556. تم تأكيد وجود YFP محورة وراثياً داخل جينوم لكل مجموعة من نباتات Z. mays عن طريق تجربة مسبار للتحلل المائي. تم الحصول على شتلات Z. mays معدلة وراثياً محولة بشكل مستقر نمت من النسيج اللين callus وتحليلها لتعريف الحالات التي تحتوي على عدد نسخ منخفض (١-٢ نسخة) لوليجات تضفير T- بطول كامل full-length من ناقل pDAB108708 ثنائي وناقل pDAB101556 ثنائي مقارن. تم نقل الشتلات المعرفة إلى الصوبة وإنماءها.

تم استخدام نظام Roche للضوء Cycler480™ لتحديد عدد النسخ المعدلة وراثياً للحالات التي تكون محولة باستخدام ناقل pDAB108708 ثنائي. تستخدم الطريقة تفاعل TaqMan® ثنائي الضفيرة الذي يستخدم أوليجونيوكليوتيدات محددة للجين YFP وإلى جين مرجعي Z. mays داخلي المنشأ، إنفيرتاز invertase (رقم الانضمام لبنك الجينات: U16123.1)، في تجربة واحدة. تم تحديد عدد النسخ والتلقيح عن طريق قياس شدة YFP- المحددة لتفلور، بالنسبة لتفلور الإنفيرتاز النوعي invertase-specific fluorescence، مقارنةً بمعايير عدد النسخ المعروف.

في Z. mays المحولة باستخدام ناقل pDAB108708 ثنائي، يتم تضخيم شظية fragment جين YFP – محدد لـ DNA باستخدام مجموعة بادئة/مسبار TAQMAN® واحدة تتضمن مسبار مرقم باستخدام صبغة تفلور FAM fluorescent dye، وتم تضخيم إنثيرتاز باستخدام مجموعة بادئة primer /مسبار TAQMAN® probe ثانية تتضمن مسبار مرقم باستخدام HEX تفلور (الجدول ٢). يتم تحضير خليط تفاعل PCR كما هو مذكور في الجدول ٣، وتم تضخيم شظايا DNA المحدد للجين وفقاً للظروف المذكورة في الجدول ٤. تم تحديد عدد النسخ لقاحات العينات عن طريق قياس الكثافة النسبية للتفلور المحدد للجين المراسل، YFP، إلى تفلور محددة للجين المرجعي، إنثيرتاز، مقارنةً بمعايير عدد النسخ المعروف.

الجدول ٢. بادئ نيوكليوتيد تقدمي وعكسي ومسبارات تفلور fluorescent probes (مخلقة بواسطة Integrated DNA Technologies, Coralville, IA)

اسم البادئة	هوية تتابع رقم:	تتابع البادئة
بادئة YFP تقدمية	هوية تتابع رقم: ٨	GATGCCTCAGTGGGAAAGG
بادئة YFP عكسية	هوية تتابع رقم: ٩	CCATAGGTGAGAGTGGTGACAA
مسبار YFP	هوية تتابع رقم: ٤١	مسبار ROCHE UPL رقم ١٢٥ CTTGGAGC رقم 04693604001 Cat (Roche, Indianapolis, IN)
معزز إنثيرتاز تقدمي	هوية تتابع رقم: ١٠	TGGCGGACGACGACTTGT
معزز إنثيرتاز عكسي	هوية تتابع رقم: ١١	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT
مسبار إنثيرتاز	هوية تتابع رقم: ١٢	5′HEX/CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTAC C/3BHQ_1/3′
معزز AAD1 تقدمي	هوية تتابع رقم: ١٣	TGTTCGGTTCCCTCTACCAA
معزز AAD1 عكسي	هوية تتابع رقم: ١٤	CAACATCCATCACCTTGACTGA

مسبار AAD1	هوية تتابع رقم: ١٥	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA

تم تكوين المعايير عن طريق تخفيف الناقل، pDAB108708، في Z. mays B104 جينومي DNA (gDNA) للحصول على معايير بعلاقة معروفة لـ pDAB108706: gDNA. على سبيل المثال، تم تحضير العينات التي بها نسخة واحدة؛ نسختين؛ أربع نسخ لناقل DNA لكل نسخة من Z. mays B104 gDNA. تم تقييم تخفيفات نسخة واحدة ونسختين من pDAB108706 المختلطة باستخدام معيار Z. mays B104 gDNA مقابل حالة Z. mays مقارن تكون معروفة بأنها أحادية التلقيح، وحالة Z. mays مقارن تكون معروفة بأنها ثنائية التلقيح (حالة Z. mays ٢٧٨؛ انظر منشور براءة الاختراع الدولي PCT رقم براءة الاختراع الدولية ٢أ٢٠٢٢٤٦٩/٢٠١١). تم إجراءة تجربة TaqMan® ثنائية الضفيرة باستخدام أوليجونيوكليوتيدات محددة لجين AAD1 وأوليجونيوكليوتيدات محددة لجين مرجعي Z. mays داخلي المنشأ، إنفيرتاز، عن طريق تضخيم وكشف شظية DNA محددة للجين لـ AAD1 باستخدام مجموعة بادئة/مسبار TAQMAN® واحدة تتضمن مسبار مرقم باستخدام صبغة تفلور FAM، وعن طريق تضخيم وكشف شظية DNA محددة لجين الإنفيرتاز باستخدام مجموعة بادئة/مسبار TAQMAN® ثانية تتضمن مسبار مرقم باستخدام HEX تفلور (الجدول ٢). تم تحضير خليط تفاعل TaqMan® AAD1 كما هو مذكور في الجدول ٣ وتم تضخيم الشظايا المحددة وفقاً للظروف المذكورة في الجدول ٤.

الجدول ٣. خليط تفاعل TAQMAN® PCR.

عدد التفاعلات	ميكرولتر لكل منها	التركيز النهائي
H2O	٠.٥ ميكرولتر	-
PVP (١٠٪)	٠.١ ميكرولتر	٠.١٪
ROCHE 2X Master Mix	٥ ميكرولتر	X١
بادئة YFP تقدمية (١٠ ميكرومولار)	٠.٤ ميكرولتر	٠.٤ ميكرومولار

بادئة YFP عكسية (١٠ ميكرومولار)	٠.٤ ميكرولتر	٠.٤ ميكرومولار
مسبار #١٢٥YFP UPL (٥ ميكرومولار)	٠.٤ ميكرولتر	٠.٢ ميكرومولار
معزز إنفيرتاز تقدمي (١٠ ميكرومولار)	٠.٤ ميكرولتر	٠.٤ ميكرومولار
معزز إنفيرتاز عكسي (١٠ ميكرومولار)	٠.٤ ميكرولتر	٠.٤ ميكرومولار
مسبار إنفيرتاز (٥ ميكرومولار)	٠.٤ ميكرولتر	٠.٢ ميكرومولار
عينة DNA	٢.٠ ميكرولتر	–
إجمالي حجم التفاعل	١٠ ميكرولتر	–

تم تحليل مستوى التفلور المولد لكل تفاعل باستخدام Roche LightCycler 480™ Thermocycler وفقاً لتوجيهات المصنّع. تم تنفيذ جزيء التفلور FAM بكثافة بصرية تبلغ ٥١٠/٤٦٥ نانومتر، وتم إثارة جزيء الفلور HEX بكثافة بصرية optical density تبلغ ٥٨٠/٥٣٣ نانومتر. تم تحديد عدد النسخ عن طريق مقارنة قيم مستهدفة/مرجعية للعينات غير المعروفة (حصيلة بواسطة LightCycler 480™) إلى قيم مستهدفة/مرجعية لأربع معايير عدد النسخ المعروف (Null، ١- نسخة (hemi)، ٢- نسخة (homo) و ٤- نسخ).

الجدول ٤. ظروف الدورة الحرارية Thermocycler لتضخيم PCR.

خطوات PCR	درجة الحرارة (درجة مئوية)	الزمن	عدد الدورات
خطوة ١	٩٥	١٠ دقائق	١
خطوة ٢	٩٥	١٠ ثواني	٤٠
	٥٩	٣٥ ثانية	
	٧٢	ثانية واحدة	
خطوة ٣	٤٠	١٠ ثواني	١

تم عرض النتائج من تحليل عدد النسخ المعدلة وراثياً لنباتات معدلة وراثياً تم الحصول عليها عن طريق التحويل باستخدام معزز ثنائي الاتجاه ZmUbi1 construct (pDAB108706)، ونباتات معدلة وراثياً تم الحصول عليها عن طريق التحويل باستخدام معزز موحد الاتجاه مقارن جزء منشأ ZmUbi1 YFP (pDAB101556) في الجدول ٥. تم نقل النباتات فقط باستخدام ١-٢ نسخة من تحويل yfp إلى الصوبة لتحليلات التعبير الجيني الإضافي.

الجدول ٥. تقدير عدد النسخ المعدلة وراثياً للنباتات المعدلة وراثياً التي تم الحصول عليها من معزز ثنائي الاتجاه وأجزاء منشأ مقارنة.

جزء منشأ	عدد الأجنة المحولة	عدد الحالات الموجبة	١-٢ نسخة من YFP
pDAB101566	١٠٠	٣١	١٣
pDAB108708	١١٣	٢٦	١٦

المثال ٦: التعبير الجيني المستقر للنبات بالكامل لجينات متصل بشكل عملى بمعزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي.

كل النباتات التي تحتوي على عدد نسخ منخفض من البلازميد الثنائي pDAB108708، والنباتات التي تحتوي على عدد نسخ منخفض من البلازميد الثنائي المقارن pDAB101556، تم إنماء في صوبة. تم تحليل تلك النباتات باستخدام مجهر، حيث يمكن ملاحظة الصور الموضحة للتعبير عن YFP في T0 نباتات Z. mays التي تكون مستقرة المحولة باستخدام جزء منشأ لحمض نووي نموذجي يتضمن مجموعة تعبير جيني YFP متصل بشكل عملى بمعزز ثنائي الاتجاه SCBV تخليقي (pDAB108708). توضح الأمثلة النموذجية للتعبير الجيني المستقر عن YFP في الورق ونسيج جذر نباتات ذرة T0 مطفرة تم الحصول عليها من أجنة Z. mays المحولة باستخدام pDAB108708 تعبير جيني جيد عن YFP. قد يحرك معزز SCBV ثنائي الاتجاه التعبير الجيني القوي عن YFP تشفر تتابعات في كلاً من أنسجة الورق وأنسجة الجذر. يؤكد التحليل المجهري أيضاً أن عنصر أدنى معزز Min-UbiP1 في معزز SCBV ثنائي الاتجاه قد يحرّك التعبير عن YFP عند مستويات تعبير جيني مشابه مقارنةً بنباتات Z. mays المحولة باستخدام بلازميد ثانوي مقارن (pDAB101556) يحتوي على معزز ZmUbi1 ثنائي

يحرّك التعبير الجيني عن تتابع تشفير YFP. توضح النباتات المقارنة تعبير مستقر عن YFP في أنسجة الورق وأنسجة الجذر.

المثال ٧: تحليل بقعة Western Blot لجينات متصل بشكل عملى بمعزز SCBV ثنائي الاتجاه تخليقي

إجمالي بروتين قابل للذوبان Total Soluble Protein: تم أخذ عينات من نباتات T0 ذرة محولة عند المرحلة التنموية V6 developmental stage. تم أخذ عينات من إجمالي أربع ورقات مشتراة من الورق غير المطوي unfolded leaf الأصغر في مصفوفة أنابيب matrix tube ووضعها داخل صندوق ذو صفوف matrix box. بالنسبة للعينة السالبة، تم أخذ عينات من أربع ورقات مشتراة من نبتتين من ذرة B104 غير محولة عند المرحلة التنموية V6 في أنبوب مصفوف. يتم وضع كرية صلبة steel bead في أنابيب المصفوفة مع العينات، وبعد ذلك يتم إضافة ٤٠٠ ميكرولتر PBST إلى كل أنبوب. تم تغطية الأنابيب، واستخلاص البروتين عن طريق تحويل إلى كريات بمعدل ١٥٠٠ لفة بالدقيقة لمدة ٥ دقائق في مطحنة أنسجة tissue grinder Kleco™. يتم وضع كريات Debris عن طريق الطرد المركزي centrifugation.

تم تخفيف عينة ٥ ميكرولتر من كل أنبوب إلى ٢٥ ميكرولتر باستخدام PBST في طبق بقياس دقيق ذو ٩٦ عين. تم تحليل تلك العينات للبروتين القابل للذوبان الإجمالي باستخدام أداة اختبار بروتين BCA (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL) وفقاً لتوجيهات المصنّع manufacturer's directions. تم تحليل ألبومين مصل بقري Bovine serum albumin (BSA) معايير مجهزة في الأداة بصورة متكررة، وتم استخدام متوسط القيم لتوليد منحنى قياسي standard curve حيث يتم استخدام بشكل متكرر لاحتساب إجمالي البروتين القابل للذوبان لكل عينة. تم معادلة إجمالي البروتين القابل للذوبان لكل عينة إلى مجم/ميكرولتر.

الجدول ٦. بروتوكول بقعة Western.

الخطوة	الظرف	الزمن
الغسلة الأولى	PBST	٥ دقائق

First Wash		
التهجين الأساسي Primary Hybridization	٢ ميكرو جم/مل مضاد- PhiYFP لأرنب (Axxora, San Diego, CA) في StartingBlock™ T20 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)	٦٠ دقائق
الشطف Rinse	PBST	٣ x ٥ دقائق
التهجين الثانوي	بيروكسيداز فجل لحصان horse radish peroxidase (HRP)- مقترن مضاد-IgG لأرنب وعنزة	٣٠ دقائق
الغسل الثاني	PBST	٣ x ٥ دقائق
الشطف	PBS	٣ x ٢ دقيقة

تحليل بقعة Western لـ PhiYFP/YFP: في طبق بقياس دقيق microtiter plate ذو ٩٦ عين، تم تخفيف كل ٥ ميكرولتر من عينة البروتين المستخلص باستخدام ٥ ميكرولتر ٢× محلول منظم Laemmli + ٢-β- ميركابتو إيثانول 2-β-mercaptoethanol. تم شراء عينات المقارنة من YFP/PhiYFP منقاة في محلول منظم HEPES (٥٠ مم HEPES، ٢٠٠ مم KCl، ١٠٪ جليسرول) من Axxora (San Diego, CA). تم تحضير العينات في نفس الطبق عن طريق تخفيف ١:١ باستخدام محلول منظم Laemmli لإنشاء منحنى عياري للتركيزات concentrations التالية: ٠.٥ نانوجم/ميكرولتر، ٠.٢٥ نانوجم/ميكرولتر، و٠.١٢٥ نانوجم/ميكرولتر. تم تسخين العينات في Thermocycler عند ٩٥ درجة مئوية لمدة ٣٠ دقيقة، وبعد ذلك تبريدها إلى ٤ درجة مئوية. تم تجميع Bio-Rad Criterion gel™ بعد ذلك مع محلول منظم SDS/MES. تم ترك العينات لتدفأ إلى درجة حرارة الغرفة، وتم تحميل ١٠ ميكرولتر من العينة على كل عين من المركبين الهلاميين. بالإضافة إلى ذلك، تم تحميل عينات من YFP/PhiYFP المنقاة لمنحنى عياري، ومرمز عقدة بروتين، في العيون من الجل. تم إدخال المركبات الهلامية gels بشكل رحلاني عند ١٥٠ ڤولت و١٥٠ ملي أمبير لمدة ٩٠ دقائق بعد الدخول، تم فتح أغطية الجل ونقل البروتينات إلى غشاء نيتروسيلولوز باستخدام iBlot

™System (Invitrogen). تم نقل البروتين من الجل إلى الغشاء عن طريق مرور تيار ٢٠ فولت لمدة ١٠ دقائق. تم إزالة غشاء النيترو سيلولوز nitrocellulose membrane ووضعه في محلول احتجاز blocking buffer منظم ™StartingBlock T20 طوال الليل عند ٤ درجة مئوية. تم فصل محلول الاحتجاز المنظم بعد ذلك، ومعالجة الغشاء باستخدام البروتوكول المذكور في الجدول ٦.

تم كشف ارتباط الجسم المضاد Antibody باستخدام نظام كشف تألق كيميائي Amersham ECL™ plus chemiluminescent بإتباع توجيهات المصنّع. تم تعريض الرقاقة Film ١٠ دقائق و٣٠ دقيقة. تم استخدام الرقاقة المعرضة لمدة ١٠ دقائق لتحديد كمية البروتين، وتم استخدام الرقاقة المعرضة بشكل زائد لمدة ٣٠ دقيقة لتأكيد غياب البروتين في B104 وعينات المقارنة الأخرى. تم تسجيل الغشاء على خلفية الرقاقة المعرضة، وتم تحديد كمية البروتين بواسطة تحليل كثافة ثنائي الضفيرة pixel density analysis. تم أولاً استخدام الكثافة ثنائية الضفيرة pixel density لمعايير البروتين المنقاة purified protein standards لإنشاء منحنى عياري تم استخدامه لتحديد كمية البروتين في العينات. بالرغم من أن الغشاء يعرض ارتباط بمونومر monomer وديمير PhiYFP dimer حتى في المعيار المنقّى، يتم استخدام مونومر PhiYFP فقط لتحديد كمية التعبير الزائد عن البروتين. بعد ذلك تمت معادلة قيم البروتين إلى نانوجم/ميكرولتر. تم احتساب نسبة البروتين القابل للذوبان الإجمالية المعادلة (TSP) إلى PhiYFP إلى وحدات من نانوجم من YFP/مجم TSP، أو على نحو بديل، أجزاء بالمليون (ppm).

تحليل GUS لبقعة Western: يتم تحديد مقدار التعبير الجيني عن بروتين GUS بطريقة مماثلة لـ PhiYFP، بالاستثناء التالي: يتم تخفيف ١٠ ميكرولتر من عنية من مستخلص ١:١ باستخدام ٢ × 2-β + Laemmli - ميركابتو إيثانول 2-β-mercaptoethanol، محرفة عند ٩٥ درجة مئوية لمدة ٣٠ دقيقة، وبعد ذلك يتم تحميل ١٥ ميكرولتر في الجل. تم تغطية الأغشية المعالجة باستخدام رقاقة (تعرض لمدة دقيقة واحدة) باستخدام غشاء لتحليل كثافة البكسل.

تم عرض نتائج تحليل بقعة Western لـ ١٢ نبات ذرة T0 مطفرة تم الحصول عليها من أجنة Z. mays المحولة باستخدام الناقل الثنائي، pDAB108708، في الشكل ١٦. يوضح معزز

SCBV ثنائي الاتجاه التعبير الجيني القوي عن YFP وGUS تشفر تتابعات من نسيج الورق. تؤكد تلك الملاحظات أن عنصر أدنى معزز Min-UbiP1 مفصولاً عن معزز Zea mays Ubiquitin1 ومندمج بمعزز SCBV قد يعبر وراثياً عن YFP عند نفس مستويات التعبير الجيني مقارنةً بالنسيج اللين من Z. mays المحول باستخدام بلازميد ثنائي يتضمن معزز ZmUbi1 متحد الاتجاه يحرّك تتابع تشفير YFP (pDAB101556؛ انظر الشكل ١٧).

المثال ٨: جزء منشأ من تجمع مجموعة من أربع جينات

يتم استخدام جزء منشأ بلازميد pDAB105806 كبلازميد بادئ لتوليد تجمع مجموعة من أربع جينات (AAD1-2A-PhiYFP و Cry34(8V6)-2A-Cry35) المحركة بواسطة معزز DCBV واحد ثنائي الاتجاه. تم عرض خريطة ممثلة لبلازميد pDAB105806 في الشكل ٦، حيث يحتوي على معزز SCBV ثنائي الاتجاه.

تم نسخ شظية AAD1-2A-PhiYFP مشتقة من بلازميد pDAB105841 (الشكل ٢٢) إلى سلسلة ناقل قطع PstI cut vector backbone و SacI من البلازميد pDAB105806 باستخدام طرق نسخ معروفة بشكل شائع في الفن. يؤدي ذلك إلى إنتاج بلازميد pDAB105847 (الشكل ٢٢). تم نسخ شظية Cry34(8V6)-2A-Cry35 مميزة بـ NotI/XbaI تم الحصول عليها من البلازميد pDAB105840 بين مواقع NotI/SpeI من بلازميد pDAB105847 إلى جزء منشأ بلازميد pDAB105849 (الشكل ٢٣). يحتوي البلازميد pDAB105849 على مجموعات جين Cry34(8V6)-2A-Cry35 و AAD1-2A-PhiYFP على كل جانب من SCBV معزز ثنائي الاتجاه.

تم توليد ناقل ثنائي تتضمن SCBV معزز ثنائي الاتجاه، ومجموعات التعبير الجيني عن الجين Cry34(8V6)-2A-Cry35 و AAD1-2A-PhiYFP من بلازميد pDAB105849 عن طريق تفاعل GATEWAY L-R CLONASE (Invitrogen, Carlsbad, CA) داخل pDAB101917 بلازميد مقصود (الشكل ٢٤). تحتوي الناقل الناتج، pDAB108719، على Cry34(8V6)-2A-Cry35، AAD1-2A-PhiYFP، ومجموعات التعبير الجيني عن جين PAT داخل حدود T-DNA (الشكل ٢٤).

المثال ٩: جزء منشأ من مخزون مجموعة أربع جينات ثانية

يتم نسخ مشتقات شظية PhiYFP-2A-AAD1 من pDAB105844 بلازميد (الشكل ٢٥) في سلسلة ناقل قطع PstI و SacI لبلازميد pDAB105806 باستخدام طرق نسخ معروفة بشكل شائع في الفن. يؤدي ذلك إلى إنتاج pDAB105848 بلازميد (الشكل ٢٥). تم نسخ شظية Cry34(8V6)-2A-Cry35 مميزة بـ NotI/XbaI تم الحصول عليها من البلازميد pDAB105840 بين مواقع NotI/SpeI من pDAB105848 بلازميد إلى جزء منشأ pDAB105865 بلازميد (الشكل ٢٦). يحتوي بلازميد pDAB105865 على Cry34(8V6)-2A-Cry35 ومجموعات جين PhiYFP-2A-AAD1 على كل جانب من SCBV معزز ثنائي الاتجاه.

ناقل ثنائي تتضمن SCBV معزز ثنائي الاتجاه، ومجموعة جين Cry34 (8V6)-2A-Cry35 و PhiYFP-2A-AAD1 من pDAB105865 بلازميد تم توليد عن طريق تفاعل GATEWAY L-R CLONASE (Invitrogen, Carlsbad, CA) داخل pDAB101917 بلازميد مقصود (الشكل ٢٤). يحتوي الناقل الناتج، pDAB108720، على Cry34(8V6)-2A-Cry35، PhiYFP-2A-AAD1، ومجموعات التعبير الجيني عن جين PAT داخل حدود T-DNA (الشكل ٢٦).

المثال ١٠: تحول الأجرعية المورمة صبغة DAt13192

تم تحويل النواقل الثنائية pDAB108719 و pDAB108720 إلى صبغة الأجرعية المورمة الثلاثية DAt13192 (انظر طلب براءة الاختراع المؤقت الأمريكي رقم ٦١/٣٦٨٩٥). تم فصل مستعمرات بكتيرية Bacterial colonies وتم استخلاص DNA بلازميد ثنائي والتحقق منها عن طريق قيود restriction إنزيم الهضم enzyme digestions.

المثال ١١: التحول إلى الذرة

تعقيم السنبلة وفصل الأجنة: للحصول على أجنة ذرة غير ناضجة، تم إنماء نباتات من Zea mays (c.v. B104) في الصوبة وتلقيح ذاتي أو أشقائي لإنتاج السنبلة. تم تجميع السنابل تقريباً ٩-١٢ يوم بعد التلقيح. في يوم التجربة، يتم تعقيم سطح السنابل عن طريق الغمر في محلول

٢٠٪ من مبيّض صوبة، حيث يحتوي على ٥٪ صوديوم هيبوكلوريت sodium hypochlorite، والهز لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة، يلي ذلك ثلاث شطفات في ماء معقم. بعد التعقيم sterilization، تم تشريح الأجنة الملقحة غير الناضجة (١.٥-٢.٢ مم) في جو معقم من كل سنبلة وتوزيعها بشكل عشوائي في أنابيب طرد مركزي دقيقة تتضمن وسط إصابة سائل (وسط LS Basal، ٤.٤٣ جم/لتر؛ محلول ڤيتامين N6 [X١٠٠٠]، ١.٠٠٠ مل/لتر؛ L- برولين، ٧٠٠.٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٦٨.٥ جم/لتر؛ جلوكوز، ٣٦.٠ جم/لتر؛ ٢، ٤- أيام، ١.٥٠ مجم/لتر. بالنسبة لمجموعة معطاة من التجارب، تم استخدام الأجنة المسحوبة من ٢-٣ سنابل لكل معالجة.

بداية استنبات الأجرعية: تم وضع بقعة مخزون جليسرول من سلالات الأجرعية تتضمن النواقل الثنائية الموصوفة أعلاه على أطباق أدنى وسط AB تتضمن مضادات حيوية ملائمة وتم إنماءها عند ٢٠ درجة مئوية لمدة ٣-٤ أيام. تم التقاط مستعمرة واحدة ووضعها على أطباق YEP تتضمن نفس المضادات الحيوية وتم احتضانها عند ٢٨ درجة مئوية لمدة ١-٢ يوم.

استنبات الأجرعية والاستنبات المشترك: في يوم التجربة، تم التقاط مستعمرات الأجرعية من طبق YEP، معلق في ١٠ مل من وسط إصابة في أنبوب يمكن التخلص منه سعة ٥٠ مل، وتم تعديل كثافة الخلية إلى OD600 = ٠.٢-٠.٤ نانومتر باستخدام مقياس طيف ضوئي. تم وضع استنباتات الأجرعية على هزاز دوار عند ١١٥ لفة بالدقيقة، درجة حرارة الغرفة، أثناء إجراء تشريح للجنين. تم فصل الأجنة الملقحة غير الناضجة بين ١.٥-٢.٢ مم في الحجم من حبات الذرة المعقمة ووضعها في ١ مل من وسط الإصابة وغسلها مرة واحدة في نفس الوسط. تمت إضافة معلق الأجرعية (٢ مل) إلى كل أنبوب وتم قلب الأنابيب حوالي ٢٠ مرة ثم هزها لمدة ١٠-١٥ دقيقة. تم نقل الأجنة على وسط الاستنبات المشترك (أملاح MS، ٤.٣٣ جم/لتر؛ L- برولين، ٧٠٠.٠ مجم/لتر؛ إنوسيتول عضلي، ١٠٠.٠ مجم/لتر؛ تحلل مائي لكازين إنزيمي ١٠٠.٠ مجم/لتر؛ ديكامبا ٣.٣٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٣٠.٠ جم/لتر؛ Gelzan™، ٣.٠٠ جم/لتر؛ ڤيتامين- MS معدّل [X١٠٠٠]، ١.٠٠٠ مل/لتر؛ AgNo3، ١٥.٠ مجم/لتر؛ أسيتو سيرينجون، ١٠٠.٠ ميكرومولار)، موجه باستخدام قصيغة موجهة لأعلى، والاحتضان لمدة ٣-٤ أيام في الضوء عند ٢٥ درجة مئوية.

يمكن ملاحظة التعبير الجيني العابر عن YFP/PhiYFP: التعبير الجيني عن YFP/PhiYFP العابر في الأجنة المحولة بعد ٣ أيام من الاستنبات المشترك باستخدام الأجرعية. تمت ملاحظة الأجنة تحت ميكروسكوب مجسم (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL) باستخدام مرشح YFP ومصدر ضوء ٥٠٠ نانومتر.

اختيار وإعادة توليد نسيج لين من حالات مفترضة: بعد فترة الاستنبات المشترك، تم نقل الأجنة إلى وسط استقرار (أملاح MS، ٤.٣٣ جم/لتر؛ L- برولين، ٧٠٠٠٠ مجم/لتر؛ إنوسيتول عضلي، ١٠٠٠٠ مجم/لتر؛ MES [(حمض ٢-(n- مورفولينو)- إيثان سلفونيك)، حمض حر]، ٥٠٠٠٠ مجم/لتر؛ تحلل مائي لكازين إنزيمي، ١٠٠٠٠ مجم/لتر؛ ديكامبا، ٣.٣٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٣٠٠٠ جم/لتر؛ Gelzan™، ٢.٣٠ جم/لتر؛ ڤيتامين- MS معدّل [X١٠٠٠]، ١.٠٠ مل/لتر؛ AgNO3، ١٥.٠ مجم/لتر؛ كاربينيسيلين، ٢٥٠٠٠ مجم/لتر) بدون عامل انتقائي والاحتضان في ٢٤ ساعة ضوء بكثافة ضوء ٥٠ ميكرومول دقيقة-٢.ثانية -١ لمدة ٧ أيام عند ٢٨ درجة مئوية. تم نقل الأجنة على وسط اختيار ١ (أملاح MS، ٤.٣٣ جم/لتر؛ L- برولين، ٧٠٠٠٠ مجم/لتر؛ إنوسيتول عضلي، ١٠٠٠٠ مجم/لتر؛ MES [(حمض ٢-(n- مورفولينو)- إيثان سلفونيك)، حمض حر]، ٥٠٠٠٠ مجم/لتر؛ تحلل مائي لكازين إنزيمي، ١٠٠٠٠ مجم/لتر؛ ديكامبا، ٣.٣٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٣٠٠٠ جم/لتر؛ Gelzan™، ٢.٣٠ جم/لتر؛ ڤيتامين- MS معدّل [X١٠٠٠]، ١.٠٠ مل/لتر؛ AgNO3، ١٥.٠ مجم/لتر؛ كاربينيسيلين، ٢٥٠٠٠ مجم/لتر)، تتضمن ٣ مجم/لتر بايالافوس والاحتضان في ٢٤ ساعة ضوء بكثافة ضوء ٥٠ ميكرومول دقيقة-٢.ثانية-١ لمدة ٧ أيام عند ٢٨ درجة مئوية.

تم نقل الأجنة ذات كالس تخلقي تكاثري على وسط اختيار ٢ (أملاح MS، ٤.٣٣ جم/لتر؛ إنوسيتول عضلي، ١٠٠٠٠ مجم/لتر؛ L- برولين، ٧٠٠٠٠ مجم/لتر؛ MES [(حمض ٢-(n- مورفولينو)- إيثان سلفونيك)، حمض حر]، ٥٠٠٠٠ مجم/لتر؛ تحلل مائي لكازين إنزيمي، ١٠٠٠٠ مجم/لتر؛ ديكامبا، ٣.٣٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٣٠٠٠ جم/لتر؛ Gelzan™ ٢.٣٠ جم/لتر؛ ڤيتامين- MS معدّل [X١٠٠٠]، ١.٠٠ مل/لتر؛ AgNo3، ١٥.٠ مجم/لتر؛ كاربينيسيلين، ٢٥٠٠٠ مجم/لتر)، تتضمن ٥ مجم/لتر بايالافوس واحتضانها في ٢٤ ساعة ضوء بكثافة ضوء ٥٠ ميكرومول دقيقة-٢.ثانية-١ لمدة أخرى ١٤ يوم عند ٢٨ درجة مئوية. تسمح خطوة الاختيار

هذه للنسيج اللين المعدل الوراثياً بتكاثر وتمايز إضافي. يجب أن يستغرق اختيار النسيج اللين فترة لا تقل عن ثلاثة أسابيع. تم نقل كالس تخلقي تكاثري على وسط إعادة توليد ١ (أملاح MS، ٤.٣٣ جم/لتر؛ إنوسيتول عضلي، ١٠٠.٠ مجم/لتر؛ L- برولين، ٣٥٠.٠ مجم/لتر؛ MES [(حمض ٢-(n- مورفولينو)- إيثان سلفونيك)، حمض حر]، ٢٥٠.٠ مجم/لتر؛ تحلل مائي لكازين إنزيمي، ٥٠.٠ مجم/لتر؛ NAA، ٠.٥٠٠ مجم/لتر؛ ABA، ٢.٥٠ مجم/لتر؛ BA، ١.٠٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٤٥.٠ جم/لتر؛ Gelzan™ ٢.٥٠ جم/لتر؛ ڤيتامين- MS معدّل [X١٠٠٠]، ١.٠٠ مل/لتر؛ AgNO3، ١.٠٠ مجم/لتر؛ كاربينيسيلين، ٢٥٠.٠ مجم/لتر)، تتضمن ٣ مجم/لتر بايالافوس والاستنبات في ٢٤ ساعة ضوء بكثافة ضوء ٥٠ ميكرومول دقيقة-٢.ثانية-١ لمدة ٧ أيام عند ٢٨ درجة مئوية.

تم نقل كالس تخلقي مع الفسيلة/البراعم على وسط إعادة توليد ٢ (أملاح MS، ٤.٣٣ جم/لتر؛ ڤيتامين- MS معدّل [X١٠٠٠]، ١.٠٠ مل/لتر؛ إنوسيتول عضلي، ١٠٠.٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٦٠.٠ جم/لتر؛ Gellan Gum G434™، ٣.٠٠ جم/لتر؛ كاربينيسيلين، ٢٥٠.٠ مجم/لتر)، تتضمن ٣ مجم/لتر بايالافوس. تم احتضان الاستنبات تحت الضوء لمدة ٢٤ ساعة بكثافة ضوء ٥٠ ميكرومول دقيقة-٢.ثانية-١ لمدة ٧-١٠ أيام عند ٢٨ درجة مئوية. تم نقل الفسائل الصغيرة بجذور أساسية لإطالة الفسيلة ووسط تجذيري (أملاح MS، ٤.٣٣ جم/لتر؛ محلول ڤيتامين N6 [X١٠٠٠]، ١.٠٠ مل/لتر؛ إنوسيتول عضلي، ١٠٠.٠ مجم/لتر؛ سكروز، ٣٠.٠ جم/لتر؛ آجار ٥.٥٠ جم/لتر؛ في طبق نبات واحتضانها تحت ٨/١٦ ساعات ضوء/ظلام عند ٩٠ ميكرومول دقيقة-٢.ثانية-١ لمدة ٧ أيام عند ٢٨ درجة مئوية. تم اختيار الشتلات المعدلة وراثياً المفترضة السليمة ثم احتضانها في ٨/١٦ ساعات ضوء/ظلام عند ٢٠٠ ميكرومول دقيقة-٢.ثانية-١ لمدة أخرى ٢-٥ أيام عند ٢٥ درجة مئوية وتم تحليلها لتحديد عدد النسخ المعدلة وراثياً والنقل إلى الصوبة.

المثال ١٢: التعبير الجيني عن PhiYFP العابر

تم إجراء التعبير الجيني العابر عن PhiYFP من أجنة Zea mays محولة باستخدام pDAB108719. يمكن لمعزز SCBV ثنائي الاتجاه أن يعبر عن PhiYFP من مجموعة التعبير الجيني عن جين AAD1-2A-PhiYFP، عندما لا يوضح جنين غير محول أي تفلور

PhiYFP. يمكن ملاحظة مستوى مشابه للتعبير الجيني عن PhiYFP من أجنة Zea mays محولة باستخدام بلازميد pDAB105748 ثنائي (الشكل ٢٠) تتضمن Zea mays موحد الاتجاه معزز Ubi1 (Zm) يحرّك تتابع تشفير PhiYFP أحادية تعرض مستوى متوقع من التعبير الجيني لـ YFP/PhiYFP. يمكن ملاحظة التعبير الجيني العابر عن PhiYFP من أجنة Zea mays محولة باستخدام pDAB108720، حيث قد يعبر معزز Zm Ubi1 ثنائي الاتجاه عن PhiYFP من مجموعة التعبير الجيني عن جين PhiYFP-2A-AAD1.

المثال ١٣: التعبير الجيني عن PhiYFP في ذرة محولة بشكل مستقر

التعبير الجيني عن PhiYFP في نسيج Zea mays لين محوّل بشكل مستقر محرك بواسطة معزز Zm Ubi1 ثنائي الاتجاه: توضح أجنة Zea mays محولة باستخدام ناقل pDAB108719 الثنائي تتضمن مجموعة التعبير الجيني عن جين AAD1-2A-PhiYFP تعبير PhiYFP جيد. قد يحرّك معزز SCBV ثنائي الاتجاه التعبير الجيني القوي عن PhiYFP. تؤكد تلك النتائج أن عنصر أدنى معزز Min-UbiP1 لمعزز SCBV ثنائي الاتجاه يكون قادراً على التعبير عن جين مبلّغ، على سبيل المثال PhiYFP أو YFP. تكون مستويات التعبير الجيني عن بروتين PhiYFP متشابهة مقارنةً بنسيج Zea mays لين محول باستخدام ناقل ثنائي مقارن حيث يتضمن معزز Zm Ubi1 موحد الاتجاه يحرّك تتابع تشفير PhiYFP (pDAB105748). لا يتم كشف التعبير الجيني عن PhiYFP في النسيج اللين المقارن السالب الذي لا يكون محولاً باستخدام بنية ثنائية ولا يحتوي على تتابعات تشفير PhiYFP.

توضح أجنة Zea mays محولة باستخدام الناقل الثنائي pDAB108720 حيث يحتوي على مجموعة التعبير الجيني عن جين PhiYFP-2A-AAD1 تعبير PhiYFP جيد. قد يحرّك معزز SCBV ثنائي الاتجاه التعبير الجيني القوي عن PhiYFP. تؤكد تلك النتائج أن عنصر أدنى معزز Min-UbiP1 لمعزز SCBV ثنائي الاتجاه يكون قادراً على التعبير عن جين مبلّغ، على سبيل المثال PhiYFP أو YFP.

المثال ١٤: تقدير عدد النسخ المعدلة وراثياً

تقدير عدد النسخ المعدلة وراثياً باستخدام Real Time TaqMan™ PCR: تم تحويل نباتات Zea mays باستخدام نواقل ثنائية تتضمن معزز SCBV ثنائي الاتجاه، pDAB108719 و pDAB108720، وتم تحويل نباتات أخرى باستخدام ناقل ثنائي مقارن، pDAB105748. تم تأكيد وجود تتابع تشفير (PhiYFP، AAD1، Cry34، Cry35، Pat) داخل جينوم نباتات Z. mays المعدلة وراثياً إلى pDAB108719 و pDAB108720 بواسطة تجربة مسبار تحلل مائي TaqMan. تم تحليل النباتات المعدلة وراثياً إلى ناقل مقارن pDAB105748 لتحديد وجود تتابع PhiYFP. تم الحصول على شتلات Z. mays المعدلة وراثياً المحولة بشكل مستقر التي نمت من النسيج اللين وتحليلها لتعريف الحالات التي تحتوي على عدد نسخ منخفض (١-٢ نسخة) لوليجات تضفير T-strand inserts T- بطول كامل من النواقل الثنائية pDAB108719 و pDAB108720، وناقل ثنائي مقارن pDAB105748. تم تقديم الشتلات المؤكدة إلى الصوبة وإنماءها.

تم استخدام نظام Roche ضوء Cycler480™ لتحديد عدد النسخ المعدلة وراثياً للحالات التي تكون محولة باستخدام الناقل الثنائي pDAB108719 و pDAB108720. الطريقة التي تستخدم تفاعل TaqMan® ثنائي الضفيرة التي تستخدم أوليجونيوكليوتيدات خاصة لتتابع التشفير وجين Z. mays مرجعي داخلي المنشأ، إنفيرتاز (رقم الانضمام لبنك الجينات: U16123.1)، في تجربة واحدة. تم تحديد عدد النسخ والتلقيح عن طريق قياس شدة تفلور تتابع التشفير الخاصة، بالنسبة لتفلور الإنفيرتاز النوعي، مقارنةً بمعايير عدد النسخ المعروف.

الجدول ٧. بادئ نيوكليوتيد تقدمي وعكسي ومسبارات تفلور (مخلقة بواسطة Integrated DNA Technologies, Coralville, IA).

اسم البادئة	تتابع البادئة
بادئة YFP تقدمية	GATGCCTCAGTGGGAAAGG (هوية تتابع رقم: ٨)
بادئة YFP عكسية	CCATAGGTGAGAGTGGTGACAA (هوية تتابع رقم: ٩)

مسبار YFP	مسبار ROCHE UPL رقم ١٢٥ CTTGGAGC (هوية تتابع رقم: ٤١) رقم (Roche, Indianapolis, IN) Cat 04693604001
معزز إنفيرتاز تقدمي	TGGCGGACGACGACTTGT (هوية تتابع رقم: ١٠)
معزز إنفيرتاز عكسي	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT (هوية تتابع رقم: ١١)
مسبار إنفيرتاز	5′HEX/CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC/3BHQ_1/3′ (هوية تتابع رقم: ١٢)
معزز AAD1 تقدمي	TGTTCGGTTCCCTCTACCAA (هوية تتابع رقم: ١٣)
معزز AAD1 عكسي	CAACATCCATCACCTTGACTGA (هوية تتابع رقم: ١٤)
مسبار AAD1	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA (هوية تتابع رقم: ١٥)
بادئة Cry34 تقدمية	GCCAACGACCAGATCAAGAC (هوية تتابع رقم: ٤٢)
بادئة Cry34 عكسية	GCCGTTGATGGAGTAGTAGATGG (هوية تتابع رقم: ٤٣)
مسبار Cry34	CCGAATCCAACGGCTTCA (هوية تتابع رقم: ٤٤)
بادئة Cry35 تقدمية	CCTCATCCGCCTCACCG (هوية تتابع رقم: ٤٥)
بادئة Cry35 عكسية	GGTAGTCCTTGAGCTTGGTGTC (هوية تتابع رقم: ٤٦)
مسبار Cry35	CAGCAATGGAACCTGACGT (هوية تتابع رقم: ٤٧)
بادئة PAT تقدمية	ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGT (هوية تتابع رقم: ٤٨)
بادئة PAT عكسية	CTTTGATGCCTATGTGACACGTAAACAGT (هوية تتابع رقم: ٤٩)
مسبار PAT	GGTGTTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGG (هوية تتابع رقم: ٥٠)

بالنسبة لعينات Z. mays المحولة باستخدام النواقل الثنائية pDAB108719 و pDAB108720، يتم تضخيم شظية DNA خاصة بتتابع تشفير باستخدام مجموعة بادئة/مسبار

TaqMan® تتضمن مسبار مرقّم باستخدام صبغة تفلور FAM، ويتم تضخيم إنقيرتاز باستخدام مجموعة بادئة/مسبار TaqMan® ثانية تتضمن مسبار مرقّم باستخدام تفلور HEX (الجدول ٧). تم تحضير خليط تفاعل PCR كما هو مذكور في الجدول ٨، وتم تضخيم شظايا DNA المحدد للجين وفقاً للظروف المذكورة في الجدول ٩. تم تحديد عدد نسخ وتلقيح العينات عن طريق قياس الكثافة النسبية للتفلور المحدد لتتابع التشفير للتفلور المحدد للجين المرجعي، إنقيرتاز، مقارنةً بمعايير عدد النسخ المعروف.

تم تكوين المعايير عن طريق تخفيف الناقل (pDAB108719 أو pDAB108720) داخل Z. mays B104 جينومي DNA (gDNA) للحصول على معايير بعلاقة معروفة للناقل: gDNA. على سبيل المثال، يمكن تحضير العينات التي بها نسخة واحدة، ونسختين وأربع نسخ لناقل DNA لكل نسخة من Z. mays B104 gDNA. تم التحقق من تخفيفات نسخة واحدة ونسختين من الناقل المختلط مع معيار Z. mays B104 gDNA مقابل حالة Z. mays مقارنة التي تكون معروفة بأنها أحادية اللواقح، وحالة Z. mays مقارنة التي تكون معروفة بأنها ثنائية اللواقح (حالة Z. mays ٢٧٨؛ انظر منشور براءة الاختراع الدولي PCT رقم أ٢ ٠٢٢٤٦٩/٢٠١١). تم إجراء تجربة TaqMan® ثنائي الضفيرة التي تستخدم أوليجونيوكليوتيدات محددة لجين تتابع التشفير وأوليجونيوكليوتيدات محددة لجين مرجع Z. mays داخلي المنشأ، إنقيرتاز، عن طريق تضخيم وكشف شظية DNA محددة للجين لتتابع التشفير باستخدام مجموعة بادئة/مسبار TAQMAN® واحدة تتضمن مسبار مرقم باستخدام صبغة تفلور FAM، وعن طريق تضخيم وكشف شظية DNA محددة للجين لإنقيرتاز باستخدام مجموعة بادئة/مسبار TAQMAN® ثانية تتضمن مسبار مرقم باستخدام HEX تفلور. وفقاً للجدول ٧، تم تحضير خليط تفاعل تتابع التشفير TaqMan® كما هو مذكور في الجدول ٨ وتم تضخيم الشظايا المحددة وفقاً للظروف المذكورة في الجدول ٩.

الجدول ٨. خليط تفاعل TAQMAN® PCR.

عدد التفاعلات	ميكرولتر لكل منها	التركيز النهائي
H2O	٠.٥ ميكرولتر	-

PVP (١٠٪)	٠.١ ميكرولتر	٠.١٪
ROCHE 2X Master Mix	٥.٠ ميكرولتر	X١
بادئة تتابع تشفير تقدمية (١٠ ميكرومولار)	٠.٤ ميكرولتر	٠.٤ ميكرومولار
بادئة تتابع تشفير عكسية (١٠ ميكرومولار)	٠.٤ ميكرولتر	٠.٤ ميكرومولار
مسبار تتابع تشفير UPL#125 (٥ ميكرومولار)	٠.٤ ميكرولتر	٠.٢ ميكرومولار
معزز إنثيرتاز تقدمي (١٠ ميكرومولار)	٠.٤ ميكرولتر	٠.٤ ميكرومولار
معزز إنثيرتاز عكسي (١٠ ميكرومولار)	٠.٤ ميكرولتر	٠.٤ ميكرومولار
مسبار إنثيرتاز (٥ ميكرومولار)	٠.٤ ميكرولتر	٠.٢ ميكرومولار
قالب DNA	٢.٠ ميكرولتر	–
إجمالي حجم التفاعل	١٠ ميكرولتر	–

تم تحليل مستوى التفلور المتولد لكل تفاعل باستخدام Roche LightCycler 480™ Thermocycler وفقاً لتوجيهات المُصنّع. تم إثارة جزيء الفلورة FAM بكثافة بصرية تبلغ ٥١٠/٤٦٥ نانومتر، وتم إثارة جزيء الفلورة HEX بكثافة بصرية تبلغ ٥٨٠/٥٣٣ نانومتر. يمكن تحديد عدد النسخ عن طريق مقارنة قيم مستهدفة/مرجعية للعينات غير المعروفة (حصيلة بواسطة LightCycler 480™) إلى قيم مستهدفة/مرجعية لأربع معايير عدد النسخ المعروف (على سبيل المثال، Null، ١- نسخة (hemi)، ٢- نسخة (homo)، و٤- نسخ).

الجدول ٩. ظروف الدورة الحرارية لتضخيم PCR.

خطوات PCR	درجة الحرارة (درجة مئوية)	الزمن	عدد الدورات
خطوة ١	٩٥	١٠ دقائق	١
خطوة ٢	٩٥	١٠ ثواني	٤٠

	٥٩	٣٥ ثانية	
	٧٢	ثانية واحدة	
خطوة ٣	٤٠	١١ ثانية	١

تم تلخيص النتائج من تحليل عدد النسخ المعدلة وراثياً لنباتات معدلة وراثياً تم الحصول عليها عن طريق التحويل باستخدام أجزاء منشأ معزز SCBV ثنائي الاتجاه (pDAB108719 و pDAB108720)، ولنباتات معدلة وراثياً تم الحصول عليها عن طريق التحويل باستخدام جزء منشأ معزز موحد الاتجاه مقارن ZmUbi1 PhiYFP (pDAB105748) في الجدول ١٠. تم نقل النباتات فقط ذات ١-٢ نسخة من كل المحورة وراثياً إلى الصوبة لتحليلات التعبير الجيني الأخرى.

الجدول ١٠. تقدير عدد النسخ المعدلة وراثياً للنباتات المعدلة وراثياً التي تم الحصول عليها من معزز ثنائي الاتجاه وأجزاء منشأ مقارنة.

البنية	عدد الأجنة المحولة	عدد الحالات الموجبة	١-٢ نسخة من كل الجينات
pDAB108719	٢٥٠	٧٨	١٣
pDAB108720	٢٢٥	٥٧	١٣
pDAB105748	٣٢	٨	٢

المثال ١٥: التعبير الجيني المستقر عن PhiYFP في نباتات ذرة T0

يمكن ملاحظة التعبير الجيني المستقر عن PhiYFP في نباتات Zea mays T0 المحركة بواسطة معزز SCBV ثنائي الاتجاه: أجنة Zea mays محولة باستخدام ناقل pDAB108719 الثنائي تتضمن مجموعة التعبير الجيني عن جين .AAD1-2A-PhiYFP قد يحرّك معزز SCBV ثنائي الاتجاه التعبير الجيني القوي عن PhiYFP في كلاً من الفسيلة وأنسجة الجذر. تؤكد النتائج أن عنصر أدنى معزز Min-UbiP1 لمعزز SCBV ثنائي الاتجاه يكون قادراً على التعبير عن جين مبلّغ، على سبيل المثال PhiYFP أو YFP التي تكون مندمجة بشكل ثنائي

السيسترونيك مع AAD1 باستخدام تتابع 2A. تكون مستويات التعبير الجيني عن بروتين PhiYFP مشابهة لأجنة Z. mays المحولة باستخدام ناقل ثنائي مقارن حيث يحتوي على معزز Zm Ubi1 موحد الاتجاه يحرّك تتابع تشفير PhiYFP (pDAB105748). لا يتم كشف التعبير الجيني عن PhiYFP في النباتات المقارنة السالبة التي لا تكون محولة باستخدام بنية ثنائية ولا تحتوي على تتابعات تشفير PhiYFP.

يمكن ملاحظة التعبير الجيني عن PhiYFP في الورق وأنسجة جذر نباتات Zea mays T0 معدلة وراثياً إلى ناقل ثنائي pDAB108720 حيث يحتوي على مجموعة التعبير الجيني عن جين PhiYFP-2A-AAD1. قد يحرّك معزز SCBV ثنائي الاتجاه التعبير الجيني القوي عن PhiYFP. تؤكد النتائج أن عنصر أدنى معزز Min-UbiP1 لمعزز SCBV ثنائي الاتجاه يكون قادراً على التعبير عن جين مبلّغ، على سبيل المثال PhiYFP أو YFP مندمج بـ AAD1 مع تتابع 2A أو تتابع مشابهة لـ 2A.

المثال ١٦: تحليل Cry34، Cry35، وبروتين AAD1

تم أخذ عينات منا لنباتات في الأعمدة ١-١٠ من مصفوفة صناديق في ١.٥ مل أنابيب مخروطية إليها تمت إضافة ١ كرية صلبة يليها PBST + ٠.٥٪ BSA (٠.٦ مل). بعد ذلك تم سحق الصندوق إلى كريات لطحن العينة في Geno Grinder لمدة ٥ دقائق عند ١٥٠٠ لفة بالدقيقة ثم الطرد المركزي عند ٣٧٠٠ لفة بالدقيقة لمدة ٧ دقائق عند ٤ درجة مئوية.

تجربة Cry34/35 ELISA: في طبق عميق منفصل deep well plate ذو ٩٦ عين، تم تخفيف عينة من المستخلص ١: ٢٠٠ في PBST + ١٪ blotto. تم نقل الحجمين volumes من ٢٥ ميكرولتر من العينة المخففة إلى أطباق منفصلة ذات ٩٦ عين تم ترتيبها باستخدام مضاد - Cry34 ومضاد - Cry35 (Meso Scale Discovery). في العمود ١١ و١٢ من كل طبق تمت إضافة تركيزات عيارية من Cry34 وCry35 في PBST + ١٪ blotto (٢٥ ميكرولتر). بعد ذلك تم احتضان الأطباق أثناء الهز عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة واحدة. تم غسل الأطباق بعد ذلك باستخدام PBST (٣ × ٣٠٠ ميكرولتر). بعد ذلك تمت إضافة ٢٥ ميكرولتر من محلول من مضاد- Cry34 متقارن مع SulfoTAG ومضاد- Cry35 إلى كل

عين والاحتضان مع الهز عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة واحدة. تم غسل الأطباق بعد ذلك باستخدام PBST (٣ × ٣٠٠ ميكرولتر). بعد ذلك تمت إضافة مقدار من ١٥٠ ميكرولتر Read Buffer T (Meso Scale Discovery) وقراءة الطبق مباشرةً على قارئ SECTOR® 6000. يمكن احتساب تركيزات البروتينات في العينة باستخدام المنحنى العياري للبروتين الخاص المولد من نفس الطبق.

تجربة AAD-1 ELISA: في طبق عميق منفصل ذو ٩٦ عين، تم تخفيف عينة من المستخلص ١: ٢٠ في PBST + ٠.٥٪ BSA. تم نقل الحجمين من ٢٠٠ ميكرولتر من العينة المخففة بعد ذلك إلى أطباق ذات ٩٦ عين منفصلة تم تغطيتها باستخدام مضاد AAD1 (متوفرة بواسطة Acadia Bioscience LLC). في العمود ١١ و١٢ من كل طبق تمت إضافة تركيزات عيارية من AAD1 في PBST + ٠.٥٪ BSA (٢٠٠ ميكرولتر). بعد ذلك تمت إضافة مقدار من ٥٠ ميكرولتر من مضاد AAD1 بمجموعة بيوتين إلى كل عين وتم احتضان الأطباق أثناء الهز عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة واحدة. تم غسل الأطباق بعد ذلك باستخدام PBST (٥ × ٣٠٠ ميكرولتر). بعد ذلك تمت إضافة ١٠٠ ميكرولتر من محلول مقترن ستيبتافيدين- فوسفات قلوي steptavidin-alkaline phosphate conjugate solution إلى كل عين والاحتضان مع الهز عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة. تم غسل الأطباق plates بعد ذلك باستخدام PBST (٥ × ٣٠٠ ميكرولتر). تمت إضافة مقدار من ١٠٠ ميكرولتر من ركيزة (p- نيتروفينيل فوسفات p-nitrophenylphosphate، PNPP) بعد ذلك والاحتضان مع الهز عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٤٥ دقيقة. بعد ذلك تم قراءة الأطباق عند A405 على قارئ أطباق SpectraMax M5 (Molecular Devices). يمكن احتساب تركيزات البروتينات في العينة باستخدام المنحنى العياري المولد من نفس الطبق.

المثال ١٧: تحليل بروتين نباتات ذرة T0

تم إجراء تحليل البروتين لنباتات ذرة T0 المحركة بواسطة جزء منشأ معزز Zea mays SCBV ثنائي الاتجاه (pDAB108719) في ذلك المثال.

الجدول ١١. التعبير الجيني عن Cry34/Cry35/AAD1 في ذرة T0 نباتات pDAB108719 معدلة وراثياً

هوية النبات	Cry34 نانوجم/سم٢	Cry35 نانوجم/سم٢	AAD1| نانوجم/سم٢
١٠٢.٠٠١-[٢]١٠٨٧١٩	٥٦	٠	٢
٠٥٨.٠٠١-[٣]١٠٨٧١٩	٢٠	٠	٣
٠٦١.٠٠٢-[٣]١٠٨٧١٩	٢٥	٠	٣
٠٥٧.٠٠١-[٣]١٠٨٧١٩	٣٧	٠	١
٠٦٤.٠٠١-[٣]١٠٨٧١٩	٢٠	٠	٥
٠٠٩.٠٠١-[١]١٠٨٧١٩	٣١	٠	٣
٠١٣.٠٠١-[١]١٠٨٧١٩	١٥	٠	٨
٠١٤.٠٠١-[١]١٠٨٧١٩	٣١	٠	٤
٠١٦.٠٠١-[١]١٠٨٧١٩	٢٧	٢	٢
٠٢٠.٠٠١-[١]١٠٨٧١٩	٢٠	١٠	٥
٠٩٦.٠٠١-[٢]١٠٨٧١٩	٢٠	١٢	٧
١٠١.٠٠١-[٢]١٠٨٧١٩	٢١	٤	٣

تم عرض تحليل ELISA التمثيلي لـ ١٢ نبات ذرة T0 مطفرة تم الحصول عليها من أجنة Zea mays محولة باستخدام pDAB108719 التي تحتوي على مجموعة التعبير الجيني عن جين Cry34-2A-Cry35 باختصار في الجدول ١١. قد يحرّك معزز SCBV ثنائي الاتجاه التعبير الجيني القوي عن كلاً من Cry34 وCry35 التي تشفر تتابعات في الورق. توضح تلك

الملاحظات أن معزز SCBV ثنائي الاتجاه المنفرد في جزء منشأ pDAB108719 قد يعبر عن جينات متعددة (على سبيل المثال، Cry34، Cry35، و AAD1).

تحليل البروتين لنباتات ذرة T0 المحركة بواسطة جزء منشأ معزز Zea mays Ubiquitin1 ثنائي الاتجاه (pDAB108720): تم عرض تحليل ELISA التمثيلي لـ ٩ نباتات ذرة T0 مطفرة تم الحصول عليها من أجنة Zea mays محولة باستخدام pDAB108720 التي تحتوي على مجموعة تعبير جيني عن جين Cry34-2A-Cry35 بشكل مختصر في الجدول ١٢. قد يحرّك معزز SCBV ثنائي الاتجاه التعبير الجيني القوي عن كلاً من Cry34 و Cry35 التي تشفر تتابعات في الورق leaf.

الجدول ١٢. التعبير الجيني عن Cry34/Cry35/AAD1 في ذرة T0 نباتات pDAB108720 معدلة وراثياً

هوية النبات	Cry34 نانوجم/سم٢	Cry35 نانوجم/سم٢	AAD1 نانوجم/سم٢
٠١٧.٠٠١-[١]١٠٨٧٢٠	١٩	٢٤	١٠
٠٢٤.٠٠١-[١]١٠٨٧٢٠	٢١	٠	٩
٠٢٧.٠٠١-[١]١٠٨٧٢٠	٢٠	٢	٨
٠٣٢.٠٠١-[١]١٠٨٧٢٠	٣٢	١٢	٨
٠٨٥.٠٠١-[٢]١٠٨٧٢٠	١٦	٠	٨
٠٨٦.٠٠١-[٢]١٠٨٧٢٠	٣٠	٠	٥
٠٨٨.٠٠١-[٢]١٠٨٧٢٠	٠	٢٦	٤
٠٩٢.٠٠١-[٢]١٠٨٧٢٠	٠	٠	١٣
١٠٥.٠٠١-[٢]١٠٨٧٢٠	٢٦	٠	٢

المثال ١٨: تكدس التطفير Transgene Stacking: معززات ثنائية الاتجاه التخليقية (بيانات T1)

التعبير الجيني عن نباتات T1 المحركة بواسطة المعزز ثنائي الاتجاه أجزاء منشأ: تم اختيار عشر إلى إثنى عشر حالة نسخة منفردة لكل جزء منشأ للتحليل باستثناء أن جزء المنشأ المقارن pDAB108716 يكون به حالة واحدة فقط. تم اختبار خمس نباتات/الحالات لمرحلة V6 وتم اختبار ثلاث نباتات/الحالات لمراحل V10-12 و/R3. تم إجراء تجارب بروتين باستخدام LCMS أو ELISA.

تم عرض أجزاء المنشأ المستخدمة في ذلك المثال في الشكل ٣٠. تكون pDAB108708 (SCBV ثنائي الاتجاه (-٢٠٠)) وpDAB108709 (SCBV ثنائي الاتجاه (-٩٠)) عبارة عن أجزاء منشأ ذات معزز ثنائي الاتجاه تمثيلي خاصة بالاختراع الحالي بالإضافة إلى أجزاء منشأ مع معزز ذرة Ubi1 ثنائي الاتجاه (pDAB108706 [ZMUbi ثنائي الاتجاه (-٢٠٠)) وpDAB108707 (ZMUbi ثنائي الاتجاه (-٩٠))]؛ pDAB101556 (عينة مقارنة ZmUbi1-YFP)، pDAB108715 (SCBV بدون أدنى معزز)، وpDAB108716 (ZmUbi1 بدون أدنى معزز) تعمل كأجزاء منشأ مقارنة باستخدام معززات متحدة الاتجاه.

تم عرض نتائج التعبير الجيني النموذجية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة لبروتين YFP (LCMS) بالنانوجم/سم٢ في الشكل ٣١أ. تم عرض نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة لـ YFP RNA في الشكل ٣١ب.

تم عرض نتائج التعبير الجيني النموذجية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة لبروتين GUS (LCMS) بالنانوجم/سم٢ في الشكل ٣٢أ. تم عرض نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة لـ GUS RNA في الشكل ٣٢ب.

تم عرض نتائج التعبير الجيني النموذجية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة لبروتين AAD1 (LCMS) بالنانوجم/سم٢ في الشكل ٣٣أ. تم عرض نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة لـ AAD1 RNA في الشكل ٣٣ب.

تم عرض تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) من أجزاء المنشأ السبعة لبروتين YFP (LCMS) بالنانوجم/سم٢ في الشكل ٣٤أ. ترتبط بها نفس الرسالة في الجداول تختلف اختلافا كبيرا تم عرض تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني النسبية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة لـ YFP RNA في الشكل ٣٤ب. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

تم عرض تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) من أجزاء المنشأ السبعة لبروتين GUS (LCMS) بالنانوجم/سم٢ في الشكل ٣٥أ. ترتبط بها نفس الرسالة في الجداول تختلف اختلافا كبيرا تم عرض تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني النسبية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة لـ GUS RNA في الشكل ٣٥ب. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

تم عرض تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) من أجزاء المنشأ السبعة لبروتين AAD1 (LCMS) بالنانوجم/سم٢ في الشكل ٣٦أ. تم عرض تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني النسبية (V6) من أجزاء المنشأ السبعة لـ AAD1 RNA في الشكل ٣٦ب. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية. ترتبط بها نفس الرسالة في الجداول تختلف اختلافا كبيرا

الأشكال ٣٧أ، ٣٧ب، و٣٧ج تعرض نتائج التعبير الجيني النموذجية (V10) من أجزاء المنشأ السبعة لبروتين YFP، AAD1، وGUS (LCMS) بالنانوجم/سم٢، على التوالي.

الأشكال ٣٨أ، ٣٨ب، و٣٨ج توضح تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V10) من أجزاء المنشأ السبعة لبروتين YFP، GUS، و AAD1 (LCMS) بالنانوجم/سم٢، على التوالي. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية. مستويات لم ترتبط بها نفس الرسالة في الجداول تختلف اختلافا كبيرا.

الأشكال ٣٩أ، ٣٩ب، و٣٩ج تعرض نتائج التعبير الجيني النموذجية (R3) من أجزاء المنشأ السبعة لبروتين YFP، GUS، و AAD1 (LCMS) بالنانوجم/سم٢، على التوالي.

الأشكال ٤٠أ، ٤٠ب، و٤٠ج توضح تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (R3) من أجزاء المنشأ السبعة لبروتين YFP، GUS، و AAD1 (LCMS) بالنانوجم/سم٢، على التوالي. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

توضح النتائج أن كلاً من معززات SCBV ثنائية الاتجاه الخاصة بالاختراع الحالي ومعززات ذرة Ubi1 ثنائية الاتجاه قد يحرّك التعبير الجيني القوي عن GUS وYFP. يكون التعبير الجيني عن YFP من معزز ذرة Ubi1 ثنائي الاتجاه مشابه لـ YFP محرّك من ذرة Ubi1. يكون التعبير الجيني عن YFP من SCBV معزز ثنائي الاتجاه أعلى إلى حدٍ كبير من YFP محرّك من ذرة Ubi1 أو معزز ذرة Ubi1 ثنائي الاتجاه. مع ذلك، يصبح ذلك الاختلاف أقل بكثير عند مرحلة V10. تقترح النتائج أيضاً أن النسخ ثنائي الاتجاه له تأثير غير ملحوظ على التعبير عن GUS (التعبير عن GUS مقارنةً بأجزاء المنشأ التي تفتقر لأدنى معزز بدون التعبير عن YFP). توفر معززات SCBV ثنائية الاتجاه أيضاً تعبير جيني أعلى بكثير عن GUS مقارنةً بمعززات ذرة Ubi1 ثنائية الاتجاه.

المثال ١٩: توليفة Combination من معزز ثنائي الاتجاه وتتابع 2A ثنائية السيسترون Bicistronic لتحريك أربع محورات وراثية من معزز منفرد واحد (بيانات T1)

التعبير الجيني عن نباتات T1 المحركة بواسطة المعزز ثنائي الاتجاه أجزاء منشأ: تم اختيار عشر إلى إثنى عشر حالة نسخة منفردة لكل جزء منشأ للتحليل باستثناء أن أجزاء المنشأ المقارنة يكون بها أربع أو خمس حالات لكل جزء منشأ. تم اختبار خمس نباتات/الحالات لمرحلة V6 وتم اختبار ثلاث نباتات/الحالات لمراحل V10-12 و/R3. تم إجراء تجارب بروتين باستخدام LCMS أو ELISA.

تم عرض pDAB108719 وpDAB108720 في الشكل ١٩. تم عرض pDAB105748 وpDAB105818 في الشكل ٢٠. تم عرض أجزاء منشأ متعددة التحول الجيني الإضافية باستخدام معزز Ubi1، بما في ذلك pDAB108717 وpDAB108718 في الشكل ٤١.

تم عرض نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لـ Cry34 RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748 (ZmUbi1-YFP)، pDAB105818 (ZmUbi1-Cry34/ZmUbi1-Cry35)، pDAB108717 (YFP/AAD-1-ZmUbi1 ثنائي الاتجاه - AAD1/ZmUbi1-Cry35)، pDAB108718 (AAD1/YFP-ZmUbi1 ثنائي الاتجاه --Cry34 Cry35)، pDAB108719 (YFP/AAD1-SCBV ثنائي الاتجاه -Cry34-Cry35)،

و pDAB108720 (AAD1/YFP - SCBV ثنائي الاتجاه -Cry34-Cry35) في الشكل ٤٢أ. تم عرض نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لبروتين Cry34 (LCMS) من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٤٢ب.

تم عرض نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لـ AAD1 RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٤٣أ. تم عرض نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لبروتين AAD1 (LCMS) من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٤٣ب.

تم عرض نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لـ YFP RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٤٤أ. تم عرض نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لبروتين YFP (LCMS) من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٤٤ب.

تم عرض نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لـ Cry35 RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٤٥أ. تم عرض نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لبروتين Cry35 (ELISA) من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٤٥ب.

الشكل ٤٦ يوضح نتائج التعبير الجيني النموذجية النسبية (V6) لـ PAT RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720.

تم عرض تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لـ Cry34 RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٤٧أ. تم عرض تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لبروتين Cry34 من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٤٧ب. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

تم عرض تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لـ AAD1 RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٤٨أ. تم عرض تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لبروتين AAD1 من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٤٨ب. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

تم عرض تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لـ YFP RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٤٩أ. تم عرض تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لبروتين YFP من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٤٩ب. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

تم عرض تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لـ Cry35 RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٥٠أ. تم عرض تحليل إحصائي لنتائج التعبير

الجيني (V6) لبروتين Cry35 من نفس أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720 في الشكل ٥٠ب. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية. مستويات لم ترتبط بها نفس الرسالة في الجداول تختلف اختلافا كبيرا.

الشكل ٥١ يوضح تحليل إحصائي لنتائج التعبير الجيني (V6) لـ PAT RNA من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

الأشكال ٥٢أ، ٥٢ب، ٥٢ج، و٥٢د توضح نتائج بروتين التعبير الجيني النموذجية (V10) لـ YFP، AAD1، Cry34، و Cry35 على التوالي من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720.

الأشكال ٥٣أ، ٥٣ب، ٥٣ج، و٥٣د توضح تحليل إحصائي لنتائج بروتين التعبير الجيني (V10) لـ YFP، AAD1، Cry34، و Cry35 على التوالي من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية.

الأشكال ٥٤أ، ٥٤ب، ٥٤ج، و٥٤د توضح نتائج بروتين التعبير الجيني النموذجية (R3) لـ YFP، AAD1، Cry34، و Cry35 على التوالي من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720.

الأشكال ٥٥أ، ٥٥ب، ٥٥ج، و٥٥د توضح تحليل إحصائي لنتائج بروتين التعبير الجيني (R3) لـ YFP، AAD1، Cry34، و Cry35 على التوالي من أجزاء المنشأ الستة pDAB105748، pDAB105818، pDAB108717، pDAB108718، pDAB108719، و pDAB108720. تم إدراك القيم الوسيطة والنتائج الإحصائية. مستويات لم ترتبط بها نفس الرسالة في الجداول تختلف اختلافا كبيرا.

الشكل ٥٦ (أ-ج) يوضح نتائج نموذجية من بقعة Western لبروتين التعبير الجيني عن Cry34 شكل ٥١أ، Cry35 شكل ٥١ب، وAAD1 شكل ٥١ج من pDAB108718، pDAB108717، pDAB108719، وpDAB108720.

توضح النتائج أن الأربع محورات الوراثية كلها في أجزاء منشأ مشتقة من المعزز المنفرد تكون وظيفية بمستويات تعبير جيني جيد. توضح الجينات الثلاثة (Cry34/Cry35/AAD1) في مستويات تعبير جيني قوي يوضح تكدس Ubi1 ثنائي الاتجاه في صورة مشابهة لمستويات التعبير الجيني المقدمة بواسطة تكدس الجين المشتق من Ubi1 (DExT).

بالرغم من مناقشة عدد من السمات والتجسيمات النموذجية أعلاه، سوف يدرك أولئك المهرة في الفن أنه يمكن إجراء تعديلات، وتبديلات، وإضافات معينة وتوليفات ثانوية منها. بالتالي يكون من المقرر تفسير عناصر الحماية الملحقة وعناصر الحماية المقدمة في هذه الوثيقة فيما بعد بأنها تتضمن كل تلك التعديلات، والتبديلات، والإضافات والتوليفات الثانوية كما لو كانت ضمن مجالها وفحواها الحقيقي.

عناصر الحماية

١- عديد النيوكليوتيد تخليقي synthetic polynucleotide يتضمن أدنى عنصر معزز أساسي minimal core promoter element من جين Ubiquitin-1 من Zea mays أو Zea luxurians وتتابع نيوكليوتيد nucleotide sequence معزز وظيفي functional promoter من معزز promoter فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر Sugar Cane Bacilliform Virus.

٢- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ١، حيث يشتمل أدنى عنصر معزز أساسي minimal core promoter element على تتابع عديد النيوكليوتيد polynucleotide sequence حيث تكون ٧٥٪ مطابقة لهوية تتابع رقم: ١ أو تكملته.

٣- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ١، حيث يشتمل أدنى عنصر معزز أساسي minimal core promoter element على هوية تتابع رقم: ١ أو تكملته.

٤- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ١، يتضمن أيضاً إكسون exon من جين Ubiquitin-1 وإنترون من جين Ubiquitin-1.

٥- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ١، يتضمن أيضاً إنترون intron من جين كحول نازع للهيدروجين alcohol dehydrogenase gene.

٦- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ١، يتضمن تتابع تنظيمي عكس الاتجاه من معزز الفيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر Sugar Cane Bacilliform Virus promoter.

٧- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ٥، حيث تشتمل تتابع نيوكليوتيد المعزز الوظيفي functional promoter nucleotide sequence من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر Sugar Cane Bacilliform Virus promoter وجين الكحول النازع للهيدروجين alcohol dehydrogenase gene على هوية تتابع رقم: ٦ أو تكملته.

٨- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ١، يتضمن أيضاً عنصر منتقى element selected من المجموعة التي تشتمل على تتابع تنظيمى عكس الاتجاه (URS)، عنصر محسّن enhancer element، إكسون exon، إنترون intron، موقع بداية نسخ transcription start site، صندوق TATA box، عنصر إجماعى للصدمة الحرارية heat shock consensus element، ترجمة START translation و/أو تتابع نيوكليوتيد nucleotide sequence STOP، وتوليفات منها.

٩- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ١، يتضمن أيضاً تتابع نيوكليوتيد nucleotide sequence محل الاهتمام متصل بشكل عملى بأدنى عنصر معزز أساسي minimal core promoter element.

١٠- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ١، حيث يكون أدنى عنصر معزز أساسي minimal core promoter element من جين Zea mays Ubiquitin-1 وتتابع نيوكليوتيد المعزز الوظيفي functional promoter nucleotide sequence من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر Sugar Cane Bacilliform Virus promoter في اتجاه تكميلي عكسي reverse complimentary orientation بالنسبة لبعضها البعض في عديد النيوكليوتيد polynucleotide.

١١- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ٩، يتضمن أيضاً على عنصر منتقى element selected من المجموعة التي تتكون من تتابع تنظيمى

عكس الاتجاه upstream regulatory sequence (URS)، عنصر محسّن enhancer element، إكسون exon، إنترون intron، موقع بداية نسخ transcription start site، صندوق TATA، عنصر إجماعى للصدمة الحرارية heat shock consensus element، تتابع نيوكليوتيد لبداية START و/أو وقف STOP الترجمة، وتوليفات منها.

١٢- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ١٠، حيث يشتمل عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide على إكسون exon من جين Ubiquitin-1، إنترون intron من جين Ubiquitin-1، وإنترون من جين كحول نازع للهيدروجين alcohol dehydrogenase gene.

١٣- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ١١، يتضمن هوية تتابع رقم: ٥ أو تكملته.

١٤- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ٩، يتضمن تتابع نيوكليوتيد مشفر coding nucleotide sequence أولى محل الاهتمام متصل بشكل عملى بأدنى عنصر معزز أساسي minimal core promoter element من جين Zea mays Ubiquitin-1.

١٥- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ١٤، يتضمن تتابع نيوكليوتيد مشفر coding nucleotide sequence ثانية محل الاهتمام متصل بشكل عملى بتتابع نيوكليوتيد المعزز الوظيفي functional promoter nucleotide sequence من معزز فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر Sugar Cane Bacilliform Virus promoter.

١٦- طريقة method لإنتاج خلية معدلة وراثياً transgenic cell، تشتمل الطريقة method على:

التعديل الوراثي transforming للخلية cell باستخدام عديد النيوكليوتيد polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ١.

١٧- طريقة method لإنتاج خلية معدلة وراثياً transgenic cell، تشتمل الطريقة على:

٥ التعديل الوراثي transforming للخلية cell باستخدام عديد النيوكليوتيد polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ٩.

١٨- الطريقة method وفقاً لعنصر الحماية ١٦، حيث تكون الخلية cell عبارة عن خلية نبات plant cell.

١٠

١٩- الطريقة method وفقاً لعنصر الحماية ١٧، حيث تكون الخلية cell عبارة عن خلية نبات plant cell.

٢٠- خلية نبات plant cell يتضمن عديد النيوكليوتيد polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية

١٥ ١.

٢١- خلية نبات plant cell يتضمن عديد النيوكليوتيد وفقاً لعنصر الحماية ٩.

٢٢- عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotid وفقاً لعنصر الحماية ٤، حيث

٢٠ يكون الإكسون exon من جين Ubiquitin-1 من Zea mays أو Zea luxurians.

٢٣- جزء منشأ حمض نووي nucleic acid construct للتعبير الجيني expressing عن جينات متعددة خلايا multiple genes و/أو أنسجة tissues نبات، يتضمن،

(أ) معزز ثنائي الاتجاه bi-directional promoter، حيث يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه

٢٥ bi-directional promoter على تتابع نيوكليوتيد معزز وظيفي functional promoter

nucleotide sequence من معزز promoter فيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر Sugar Cane Bacilliform Virus (SCBV)؛ و

(ب) مجموعتين تعبير جيني expression cassettes عن الجين على النهايات المتقابلة opposite ends للمعزز ثنائي الاتجاه bi-directional promoter؛

حيث تشتمل واحدة من مجموعات التعبير الجيني عن الجين gene expression cassettes على اثنين أو أكثر من الجينات متصلة عن طريق محول ترجمة translation switch.

٢٤- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣، حيث يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه bi-directional promoter على معزز enhancer واحد على الأقل.

٢٥- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٤، حيث يشتمل جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct على ناقل ثنائي binary vector للتحول الوراثي الناتج عن الأجرعية Agrobacterium-mediated transformation.

٢٦- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣، حيث يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه bi-directional promoter على عنصر منتقى element selected من المجموعة التي تشتمل على تتابع تنظيمى عكس الاتجاه upstream regulatory sequence (URS)، عنصر محسّن enhancer element، إكسون exon، إنترون intron، موقع بداية نسخ transcription start site، صندوق TATA، عنصر إجماعى للصدمة الحرارية heat shock consensus element، وتوليفات منها.

٢٧- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣، حيث يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه bi-directional promoter على أدنى عنصر معزز أساسي minimal core promoter element من جين Ubiquitin-1 من Zea mays أو Zea luxurians.

٢٨- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٧، حيث يشتمل أدنى عنصر معزز أساسي minimal core promoter element على تتابع عديد النيوكليوتيد polynucleotide sequence ٧٥٪ مطابقة لهوية تتابع رقم: ١ أو تكملته.

٢٩- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٧، حيث يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه bi-directional promoter على إكسون exon من جين Ubiquitin-1 و/أو إنترون intron من جين Ubiquitin.

٣٠- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٧، حيث يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه bi-directional promoter على تتابع تنظيمي عكس الاتجاه من جين Ubiquitin أو معزز الفيروس عصوي الشكل مثل قصب السكر Sugar Cane Bacilliform Virus (SCBV).

٣١- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣، حيث يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه bi-directional promoter على عديد نيوكليوتيد polynucleotide لهوية تتابع رقم: ٥ أو تكملته.

٣٢- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣، حيث يشتمل المعزز ثنائي الاتجاه bi-directional promoter على عديد نيوكليوتيد polynucleotide لهوية تتابع رقم: ٦ أو تكملته.

٣٣- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣، حيث تشتمل كلا مجموعتي التعبير الجيني expression cassettes عن الجين على اثنين أو أكثر من الجينات genes متصلة عن طريق محول ترجمة translation switch.

٣٤- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣، حيث يتم اختيار محول الترجمة translation switch من المجموعة التي تشتمل على موقع دخول ريبوزوم داخلي internal ribosome entry site (IRES)، موقع تضفير بديل alternative splicing site، تتابع عديد النيوكليوتيد يشفر polynucleotide sequence coding ببتيد 2A 2A peptide، تتابع عديد النيوكليوتيد polynucleotide sequence تشفر codingببتيد مشابه لـ 2A 2A-like peptide، تتابع عديد النيوكليوتيد polynucleotide sequence تشفر coding إنتين intein، تتابع عديد النيوكليوتيد polynucleotide sequence تشفر coding موقع شطر بروتياز protease cleavage site، وتوليفات منها.

٣٥- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣، حيث لا يشتمل جين عكس الاتجاه بمحول الترجمة translational switch على كودون توقف ترجمة translation stop codon.

٣٦- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣، حيث يمكّن جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct من التعبير الجيني expression عن أربع جينات على الأقل.

٣٧- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣، حيث يمكّن جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct من التعبير الجيني expression عن جينات genes بين ثلاثة وعشرون.

٣٨- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٣٧، حيث يمكّن جزء منشأ الحمض النووي من التعبير الجيني عن جينات بين أربعة وثمانية.

٣٩- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣، حيث يكون التعبير الجيني expression عن جينات من المعزز ثنائي الاتجاه bi-directional

promoter أعلى أربع أضعاف على الأقل مقارنةً بمعزز موحد الاتجاه uni-directional promoter.

٤٠- جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣، حيث يكون التعبير الجيني expression عن جينات من المعزز ثنائي الاتجاه bi-directional promoter من ثلاثة إلى عشرة أضعاف أعلى مقارنةً بمعزز موحد الاتجاه uni-directional promoter.

٤١- طريقة method لتوليد generating نبات معدّل وراثياً transgenic plant، يتضمن التعديل الوراثي لخلية نبات plant cell باستخدام جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣.

٤٢- طريقة method لتوليد خلية معدلة وراثياً، يتضمن التعديل الوراثي للخلية transgenic cell باستخدام جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣.

٤٣- خلية نبات plant cell يتضمن جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣.

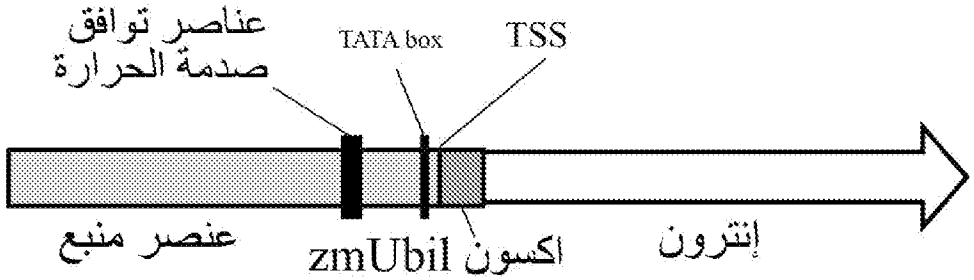
٤٤- خلية النبات plant cell وفقاً لعنصر الحماية ٤٣، حيث يكون جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct محوّل وراثياً بشكل مستقر إلى خلية النبات plant cell.

٤٥- طريقة method للتعبير الجيني expressing عن جينات متعددة خلايا multiple genes و/أو أنسجة tissues نبات، يتضمن إدخال في خلايا cells و/أو أنسجة tissues النبات جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣.

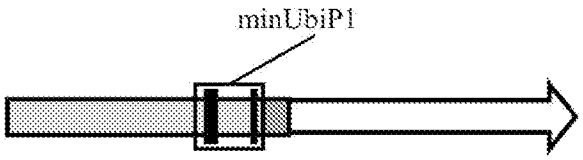
٤٦- الطريقة method وفقاً لعنصر الحماية ٤٥، حيث تكون خلايا cells و/أو أنسجة tissues النبات محولة وراثياً بشكل مستقر باستخدام جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣.

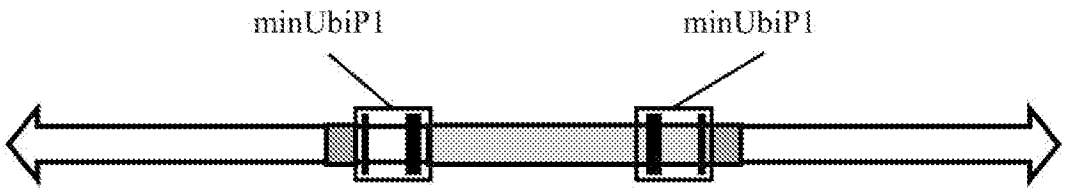
٤٧- ناقل ثنائي binary vector للتحول الوراثي الناتج عن الأجرعية Agrobacterium- mediated transformation يتضمن جزء منشأ الحمض النووي nucleic acid construct وفقاً لعنصر الحماية ٢٣.

٤٨- ناقل ثنائي binary vector للتحول الوراثي الناتج عن الأجرعية Agrobacterium- mediated transformation يتضمن عديد النيوكليوتيد التخليقي synthetic polynucleotide وفقاً لعنصر الحماية ١.

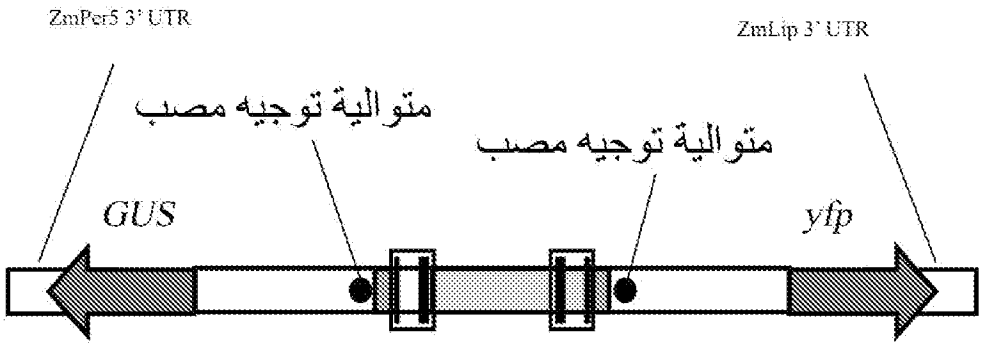

عناصر توافق
صدمة الحرارة
TATA box
TSS
عنصر منبع
zmUbil اكسون
إنترون

شكل ١

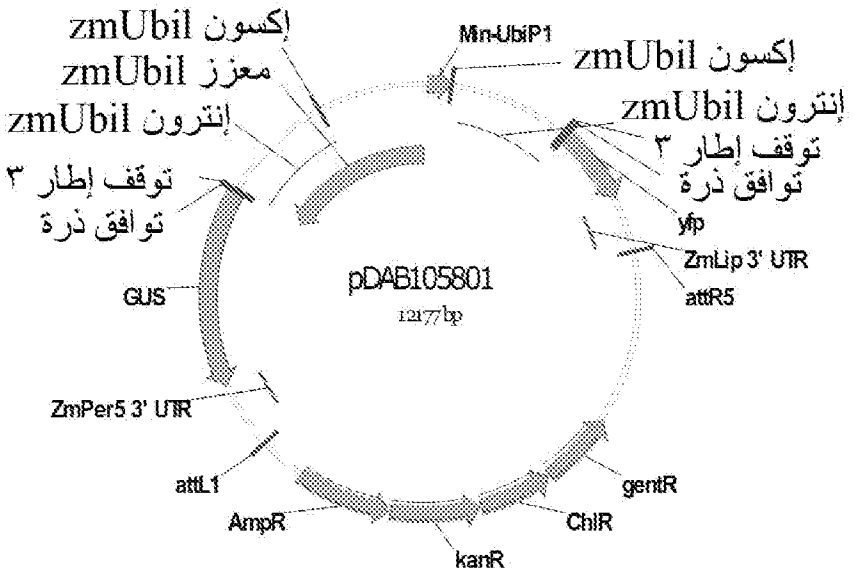

minUbiP1



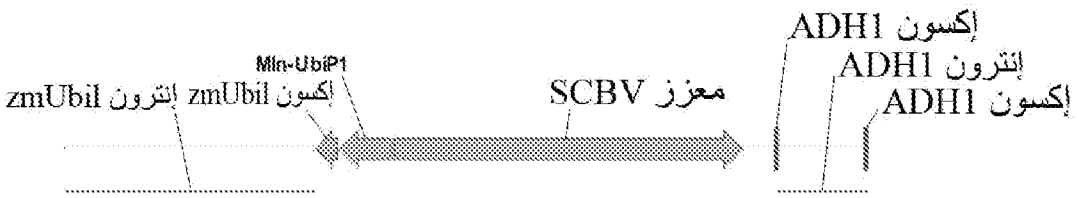
شكل ٢


ZmPer5 3' UTR
ZmLip 3' UTR
متوالية توجيه مصب
متوالية توجيه مصب
GUS
yfp

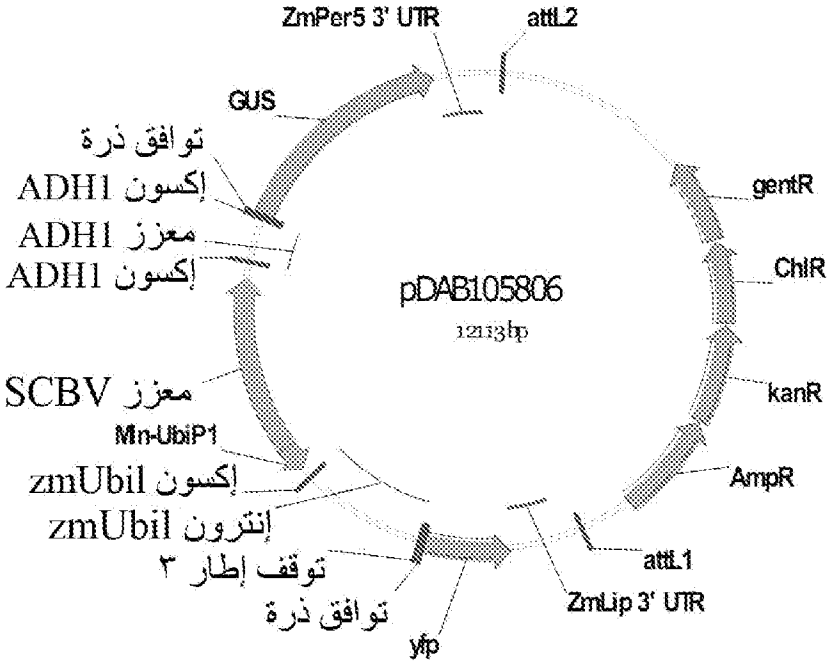
شكل ٣


إكسون zmUbil
معزز zmUbil
إنترون zmUbil
توقف إطار ٣
توافق ذرة
GUS
ZmPer5 3' UTR
attL1
AmpR
kanR
ChlR
gentR
attR5
ZmLip 3' UTR
yfp
توافق ذرة
توقف إطار ٣
إنترون zmUbil
إكسون zmUbil
Min-UbiP1
pDAB105801
12177bp

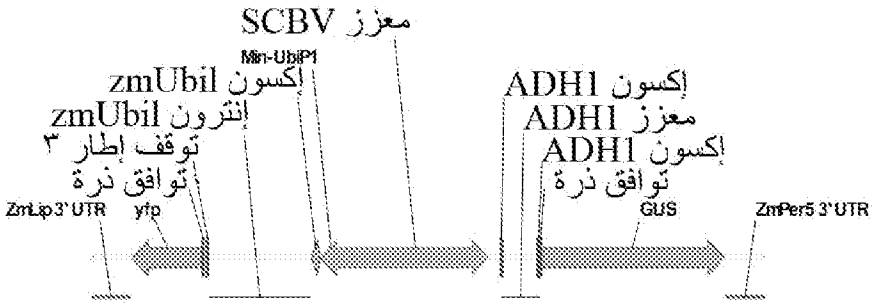
شكل ٤


إكسون ADH1
إنترون ADH1
إكسون ADH1
معزز SCBV
Mln-UbiP1
إكسون zmUbil
إنترون zmUbil

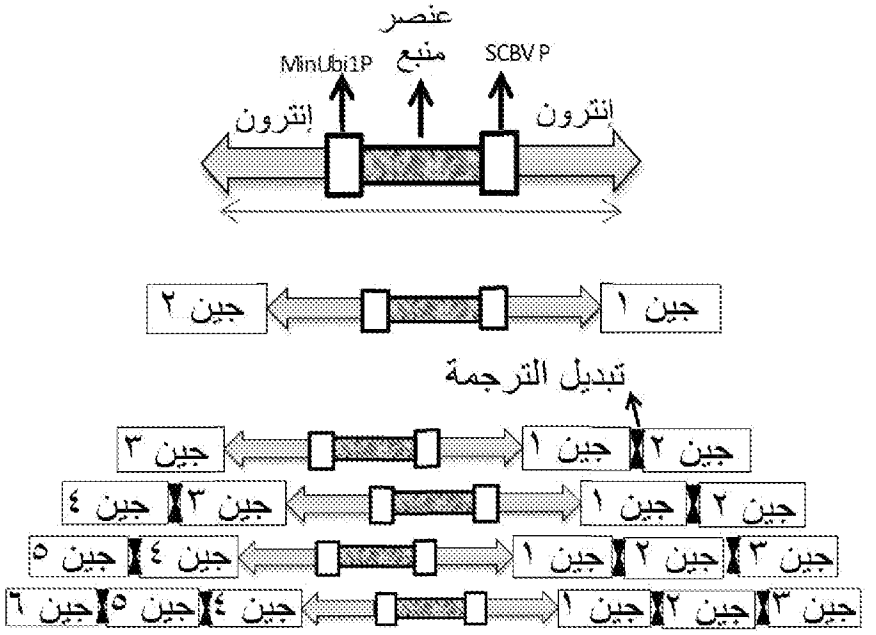
شكل ٥


ZmPer5 3' UTR
attL2
GUS
توافق ذرة
إكسون ADH1
معزز ADH1
إكسون ADH1
gentR
ChlR
pDAB105806
12113bp
kanR
معزز SCBV
Mln-UbiP1
AmpR
إكسون zmUbil
إنترون zmUbil
attL1
توقف إطار ٣
ZmLip 3' UTR
توافق ذرة
yfp

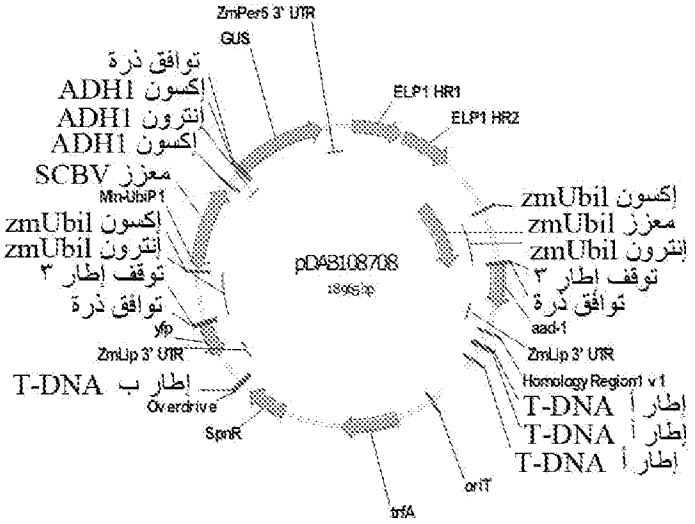
شكل ٦

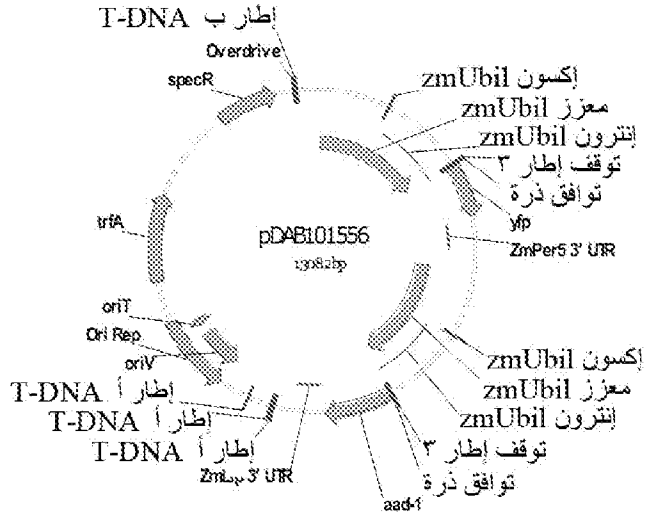

معزز SCBV
Min-UbiP1
إكسون zmUbil
إنترون zmUbil
توقف إطار ٣
توافق ذرة
ZmLip3'UTR
yfp
إكسون ADH1
معزز ADH1
إكسون ADH1
توافق ذرة
GUS
ZmPer5 3'UTR

شكل ٧


عنصر
منبع
MinUbi1P
SCBV P
إنترون
إنترون
جين ٢
جين ١
تبديل الترجمة
جين ٣
جين ١
جين ٢
جين ٤
جين ٣
جين ١
جين ٢
جين ٥
جين ٤
جين ١
جين ٢
جين ٣
جين ٦
جين ٥
جين ٤
جين ١
جين ٢
جين ٣

شكل ٨


ZmPer5 3' UTR
GUS
توافق ذرة
إكسون ADH1
إنترون ADH1
إكسون ADH1
معزز SCBV
Mtr-UbiP1
إكسون zmUbil
إنترون zmUbil
توقف إطار ٣
توافق ذرة
yfp
ZmLip 3' UTR
إطار ب T-DNA
Overdrive
SpmR
ELP1 HR1
ELP1 HR2
إكسون zmUbil
معزز zmUbil
إنترون zmUbil
توقف إطار ٣
توافق ذرة
aad-1
ZmLip 3' UTR
Homology Region1 v1
إطار أ T-DNA
إطار أ T-DNA
إطار أ T-DNA
oriT
trfA
pDAB108708


إطار ب T-DNA
Overdrive
specR
trfA
oriT
Ori Rep
oriV
إطار أ T-DNA
إطار أ T-DNA
إطار أ T-DNA
ZmLip 3' UTR
aad-1
إكسون zmUbil
معزز zmUbil
إنترون zmUbil
توقف إطار ٣
توافق ذرة
yfp
ZmPer5 3' UTR
pDAB101556

شكل ٩

هوية متوالية رقم : ١

CTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTG
CGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCGG
CAGCTACGGGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAG
ACACCCCCTCCACACCCTCT

شكل ١٠أ

هوية متوالية رقم : ٢

ctgcagaagtaacaccaaacaacagggtgagcatcgacaaaagaaacagtaccaagcaaataaatagcgtatgaaggcagggctaaaaaaatccacatatngc
tgctgcatatgccatcatccaagtatatcaagatcgaaataattataaaacatacttgtttattataatagataggtactcaaggttagagcatatgaatagatgctgcata
tgccatcatgtatatgcatcagtaaaacccacatcaacatgtatacctatcctagatcgatatttccatccatcttaaactcgtaactatgaagatgtatgacacacacat
acagttccaaaattaataaatacaccaggtagtttgaaacagtattctactccgatctagaacgaatgaacgaccgcccaaccacaccacatcatcacaaccaagc
gaacaaaaagcatctctgtatatgcatcagtaaaacccgcatcaacatgtatacctatcctagatcgatatttccatccatcttcaattcgtaactatgaatatgtatg
gcacacacatacagatccaaaattaataaatccaccaggtagtttgaaacagaaatctactccgatctagaacgaccgcccaaccagaccacatcatcacaaccaa
gacaaaaaaaaagcatgaaaagatgacccgacaaacaagtgcacggcatatattgaaataaaggaaaagggcaaaccaaaacccctatgcaacgaaacaaaaaaa
atcatgaaatcgatcccgtctgcggaacggctagagccatcccaggattcccaaagagaaacactggcaagttagcaatcagaacgtgtctgacgtacaggtcg
catccgtgtacgaacgcnagcagcacggatctaacacaaacacggntctaacacaaacatgaacagaagtagaactaccgggccctaaccatgcatggaccgg
aacgccgatctagagaaggtagagagggggggggggggaggacgagcggcgtac**CTTGAAGCGGAGGTGCCGACGGGTG**
GATTTGGGGGAGATCTGGTTGTGTGTGTGCGCTCCGAACAACACGAGGTTGGGGAGGT
ACCAAGAGGGTGTGGAGGGGGTGTCTATTTATTACGGCGGGCGAGGAAGGGAAAGCGAAGGAG
CGGTGGGAAAGGAATCCCCCGTAGCTGCCGGTGCCGTGAGAGGAGGAGGAGGCCGCCTGCCGTG
CCGGCTCACGTCTGCCGCTCCGCCACGCAATTTCTGGATGCCGACAGCGGAGCAAGTCCAACGGT
GGAGCGGAACTCTCGAGAGGGGTCCAG

شكل ١٠ب

هوية متوالية رقم : ٣

CTGCAGAAGTAACACCAAACAACAGGGTGAGCATCGACAAAAGAAACAGTACCAAGCAAATAA
ATAGCGTATGAAGGCAGGGCTAAAAAAATCCACATATAGCTGCTGCATATGCCATCATCCAAGT
ATATCAAGATCGAAATAATTATAAAACATACTTGTTTATTATAATAGATAGGTACTCAAGGTTAG
AGCATATGAATAGATGCTGCATATGCCATCATGTATATGCATCAGTAAAACCCACATCAACATGT
ATACCTATCCTAGATCGATATTTCCATCCATCTTAAACTCGTAACTATGAAGATGTATGACACAC
ACATACAGTTCCAAAATTAATAAATACACCAGGTAGTTTGAAACAGTATTCTACTCCGATCTAGA
ACGAATGAACGACCGCCCAACCACACCACATCATCACAACCAAGCGAACAAAAAGCATCTCTGT
ATATGCATCAGTAAAACCCGCATCAACATGTATACCTATCCTAGATCGATATTTCCATCCATCAT
CTTCAATTCGTAACTATGAATATGTATGGCACACACATACAGATCCAAAATTAATAAATCCACCA
GGTAGTTTGAAACAGAATTCTACTCCGATCTAGAACGACCGCCCAACCAGACCACATCATCACA
ACCAAGACAAAAAAAAAGCATGAAAAGATGACCCGACAAACAAGTGCACGGCATATATTGAAAT
AAAGGAAAAGGGCAAACCAAACCCTATGCAACGAAACAAAAAAAAATCATGAAATCGATCCCGT
CTGCGGAACGGCTAGAGCCATCCCAGGATTCCCCAAAGAGAAACACTGGCAAGTTAGCAATCAG
AACGTGTCTGACGTACAGGTCGCATCCGTGTACGAACGCTAGCAGCACGGATCTAACACAAACA
CGGATCTAACACAAACATGAACAGAAGTAGAACTACCGGGCCCTAACCATGCATGGACCGGAAC
GCCGATCTAGAGAAGGTAGAGAGGGGGGGGGGGGGGAGGACGAGCGGCGTACCTTGAAGCGGA
GGTGCCGACGGGTGGATTTGGGGGAGATCTGGTTGTGTGTGTGTGCGCTCCGAACAACACGAGG
TTGGGGAGGTACCAAGAGGGTGTGGAGGGGGTGTCTATTTATTACGGCGGGCGAGGAAGGGAA
AGCGAAGGAGCGGTGGGAAAGGAATCCCCCGTAGCTGCCGGTGCCGTGAGAGGAGGAGGAGGC
CGCCTGCCGTGCCGGCTCACGTCTGCCGCTCCGCCACGCAATTTCTGGATGCCGACAGCGGAGCA
AGTCCAACGGTGGAGCGGAACTCTCGAGAGGGGTCCAGCCGCGGAGTGTGCAGCGTGACCCGGT
CGTGCCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCTAAGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTT
TTGTCACACTTGTTTGAAGTGCAGTTTATCTATCTTTATACATATATTTAAACTTTACTCTACGAAT
AATATAATCTATAGTACTACAATAATATCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGAC
ATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCAT
GTGTTCTCCTTTTTTTTTTGCAAATAGCTTCACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCC
ATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTTTTTATAGACTAATTTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTT
AGCCTCTAAATTAAGAAAACTAAAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAGTTTAGATATAAAAT
AGAATAAAATAAAGTGACTAAAAATTAAACAAATACCCTTTAAGAAATTAAAAAAACTAAGGA
AACATTTTTCTTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGAC
ACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTC
GCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCA
GAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACG
GCACCGGCAGCTACGGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAA
TAAATAGACACCCCCTCCACACCCTCTTTCCCCAACCTCGTGTTGTTC

شكل ١١أ

GGAGCGCACACACACACAACCAGATCTCCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGGT
ACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGTTCCGGTCCATGCA
TGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGTTTGTGTTAGATCCG
TGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCAGACACGTTCTGATTGCTAACTTGCCA
GTGTTTCTCTTTGGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATTTCATGATT
TTTTTTGTTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTTGCCCTTTTCCTTTATTTCAATATATGCCGTGCACTTG
TTTGTCGGGTCATCTTTTCATGCTTTTTTTTGTCTTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGGCGGTC
GTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTTCAAACTACCTGGTGGATTTATTAATTTTGGATCTGTATG
TGTGTGCCATACATATTCATAGTTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAG
GTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTGTTCGCTTGGTTGTGA
TGATGTGGTGTGGTTGGGCGGTCGTTCATTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACTA
CCTGGTGTATTTATTAATTTTGGAACTGTATGTGTGTGTCATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAA
GATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTTACTGATGCATATAC
ATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAAACA
AGTATGTTTTATAATTATTTCGATCTTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTG
GATTTTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTCGATGCTCAC
CCTGTTGTTTGGTGTTACTTCTGCAG

شكل ١١ب

هوية متوالية رقم : ٤

AGCACTTAAAGATCTTTAGAAGAAAGCAAAGCATTTATTAATACATAACAATGTCCAGGTAGCC
CAGCTGAATTACAATACGCAACTGCTCATAATAATTCAACAAACCCAAGTAGTACACAACATCC
AGAAGCAAATAAAGCCCATACGTACCAAAGCCTACACAAGCAGCAACACTCACTGCCAGTGCCG
GTGGGTCTTTAAAGCACACGGGCCTTGACCACGCGATCCACCTTGAAACAAACTTGGTAAAATTA
AAGCAAACCAGAAGCACACACACGCCAACGCAACGCTTCTGATCGCGCGCCCAAGGCCCGGCCG
GCCAGAACGTACGACGGACACGCACACGCTGCGACCGAGCTCTAGGTGATTAAGCTAACTACTC
AAAGGTAGGTCTTGCGACAGTCAACAGCTCTGACAGTTTCTTTCAAGGACATGTTGTCTCTGTGG
TCTGTCACATCTTTGGAAAGTTTCACATGGTAAGACATGTGATGATACTCTGGAACATGAACTGG
ACCTCCACCAATGGGAGTGTTCATCTGGGTGTGGTCAGCCACTATGAAGTCGCCTTTGCTGCCAG
TAATCTCATGACAGATCTTGAAGGCTGACTTGAGACCGTGGTTGGCTTGGTCACCCCAGATGTAG
AGGCAGTGGGGAGTGAAGTTGAACTCCAAGTTCTTTCCCAACACATGACCATCTTTCTTGAAGCC
TTGACCATTGAGTTTGACCCTATTGTAGACAGACCCATTCTCAAAGGTGACTTCAGCCCTAGTCTT
GAAGTTGCCATCTCCTTCAAAGGTGATTGTGCGCTCTTGCACATAGCCATCTGGCATACAGGACT
TGTAGAAGTCCTTCAACTCTGGACCATACTTGGCAAAGCACTGTGCTCCATAGGTGAGAGTGGTG
ACAAGTGTGCTCCAAGGCACAGGAACATCACCAGTTGTGCAGATGAACTGTGCATCAACCTTTCC
CACTGAGGCATCTCCGTAGCCTTTCCCACGTATGCTAAAGGTGTGGCCATCAACATTCCCTTCCA
TCTCCACAACGTAAGGAATCTTCCCATGAAAGAGAAGTGCTCCAGATGCCATGGTGTCGTGTGG
ATCCGGTACACACGTGCCTAGGACCGGTTCAACTAACTACTGCAGAAGTAACACCAAACAACAG
GGTGAGCATCGACAAAAGAAACAGTACCAAGCAAATAAATAGCGTATGAAGGCAGGGCTAAAA
AAATCCACATATAGCTGCTGCATATGCCATCATCCAAGTATATCAAGATCGAAATAATTATAAAA
CATACTTGTTTATTATAATAGATAGGTACTCAAGGTTAGAGCATATGAATAGATGCTGCATATGC
CATCATGTATATGCATCAGTAAAACCCACATCAACATGTATACCTATCCTAGATCGATATTTCCA
TCCATCTTAAACTCGTAACTATGAAGATGTATGACACACACATACAGTTCCAAAATTAATAAATA
CACCAGGTAGTTTGAAACAGTATTCTACTCCGATCTAGAACGAATGAACGACCGCCCAACCACA
CCACATCATCACAACCAAGCGAACAAAAAGCATCTCTGTATATGCATCAGTAAAACCCGCATCA
ACATGTATACCTATCCTAGATCGATATTTCCATCCATCATCTTCAATTCGTAACTATGAATATGTA
TGGCACACACATACAGATCCAAAATTAATAAATCCACCAGGTAGTTTGAAACAGAATTCTACTCC
GATCTAGAACGACCGCCCAACCAGACCACATCATCACAACCAAGACAAAAAAAAAGCATGAAAA
GATGACCCGACAAACAAGTGCACGGCATATATTGAAATAAAGGAAAAGGGCAAACCAAACCCT
ATGCAACGAAACAAAAAAAATCATGAAATCGATCCCGTCTGCGGAACGGCTAGAGCCATCCCAG
GATTCCCCAAAGAGAAACACTGGCAAGTTAGCAATCAGAACGTGTCTGACGTACAGGTCGCATC
CGTGTACGAACGCTAGCAGCACGGATCTAACACAAACACGGATCTAACACAAACATGAACAGAA
GTAGAACTACCGGGCCCTAACCATGCATGGACCGGAACGCCGATCTAGAGAAGGTAGAGAGGG
GGGGGGGGGGGAGGACGAGCGGCGTACCTTGAAGCGGAGGTGCCGACGGGTGGATTTGGGGGA
GATCTGGTTGTGTGTGTGCGCTCCGAACAACACGAGGTTGGGGAGGTACCAAGAGGGTGTGG
AGGGGGTGTCTATTTATTACGGCGGGCGAGGAAGGGAAAGCGAAGGAGCGGTGGGAAAGGAAT
CCCCCGTAGCTGCCGGTGCCGTGAGAGGAGGAGGAGGCCGCCTGCCGTGCCGGCTCACGTCTGC
CGCTCCGCCACGCAATTTCTGGATGCCGACAGCGGAGCAAGTCCAACGGTGGAGCGGAACTCTC
GAGAGGGGTCCAGCCGCGGAGTGTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCCTCTCTAGAGATAATGAG
CATTGCATGTCTAAGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTGTCACACTTGTTTGAAGTGCAG

شكل ١٢أ

TTTATCTATCTTTATACATATATTTAAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAAT
AATATCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGT
ATTTTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTTTTTTGCAAA
TAGCTTCACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGG
TTTTTATAGACTAATTTTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAATTAAGAAAACTA

AAACTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAGTTTAGATATAAAATAGAATAAAATAAAGTGACTAA
AAATTAAACAAATACCCTTTAAGAAATTAAAAAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGTTTCGAGTAG
ATAATGCCAGCCTGTTAAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGCG
TCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAG
AGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAG
ACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTC
CTTTCCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCCTCCACACC
CTCTTTCCCCAACCTCGTGTTGTTCGGAGCGCACACACACACAACCAGATCTCCCCCAAATCCAC
CCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGGTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTC
TAGATCGGCGTTCCGGTCCATGCATGGTTAGGGCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTTGTGTT
AGATCCGTGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCAGA
CACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTTCTCTTTGGGGAATCCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCC
GCAGACGGGATCGATTTCATGATTTTTTTTGTTTCGTTGCATAGGGTTTGGTTTGCCCTTTTCCTTT
ATTTCAATATATGCCGTGCACTTGTTTGTCGGGTCATCTTTTCATGCTTTTTTTTTGTCTTGGTTGTG
ATGATGTGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTTCAAACTACCTGGTG
GATTTATTAATTTTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATATTCATAGTTACGAATTGAAGATGATG
GATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAG
ATGCTTTTTGTTCGCTTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGTTGGGCGGTCGTTCATTCGTTCTAGATC
GGAGTAGAATACTGTTTCAAACTACCTGGTGTATTTATTAATTTTGGAACTGTATGTGTGTGTCAT
ACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGA
TGTGGGTTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGA
GTACCTATCTATTATAATAAACAAGTATGTTTTATAATTATTTCGATCTTGATATACTTGGATGAT
GGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGT
ACTGTTTCTTTTGTCGATGCTCACCCTGTTGTTTGGTGTTACTTCTGCAGGTACAGTAGTTAGTTG
AGGTACAGCGGCCGCAGGGCACCATGGTCCGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAA
ACTCGACGGCCTGTGGGCATTCAGTCTGGATCGCGAAAACTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGG
GAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGTTTTAACGATCAGTTCGCCG
ATGCAGATATTCGTAATTATGCGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGAAGTCTTTATACCGAAAGGT
TGGGCAGGCCAGCGTATCGTGCTGCGTTTCGATGCGGTCACTCATTACGGCAAAGTGTGGGTCAA
TAATCAGGAAGTGATGGAGCATCAGGGCGGCTATACGCCATTTGAAGCCGATGTCACGCCGTAT
GTTATTGCCGGGAAAAGTGTACGTATCACCGTTTGTGTGAACAACGAACTGAACTGGCAGACTAT
CCCGCCGGGAATGGTGATTACCGACGAAAACGGCAAGAAAAAGCAGTCTTACTTCCATGATTTC
TTTAACTATGCCGGAATCCATCGCAGCGTAATGCTCTACACCACGCCGAACACCTGGGTGGACGA
TATCACCGTGGTGACGCATGTCGCGCAAGACTGTAACCACGCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGG
CCAATGGTGATGTCAGCGTTGAACTGCGTGATGCGGATCAACAGGTGGTTGCAACTGGACAAGG
CACTAGCGGGACTTTGCAAGTGGTGAAT

شكل ١٢ب

CCGCACCTCTGGCAACCGGGTGAAGGTTATCTCTATGAACTGTGCGTCACAGCCAAAAGCCAGA
CAGAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAGTT
CCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCGGACTTGCGTG
GCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGGATTGGGGCCAA
CTCCTACCGTACCTCGCATTACCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGGGCAGATGAACATGGCA
TCGTGGTGATTGATGAAACTGCTGCTGTCGGCTTTAACCTCTCTTTAGGCATTGGTTTCGAAGCGG
GCAACAAGCCGAAAGAACTGTACAGCGAAGAGGCAGTCAACGGGGAAACTCAGCAAGCGCACT
TACAGGCGATTAAAGAGCTGATAGCGCGTGACAAAAACCACCCAAGCGTGGTGATGTGGAGTAT
TGCCAACGAACCGGATACCCGTCCGCAAGGTGCACGGGAATATTTCGCGCCACTGGCGGAAGCA
ACGCGTAAACTCGACCCGACGCGTCCGATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACAC
CGATACCATCAGCGATCTCTTTGATGTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCAAA
GCGGCGATTTGGAAACGGCAGAGAAGGTACTGGAAAAAGAACTTCTGGCCTGGCAGGAGAAAC
TGCATCAGCCGATTATCATCACCGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACTCAATGTAC
ACCGACATGTGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGCATGGCTGGATATGTATCACCGCGTCTTTGATCG
CGTCAGCGCCGTCGTCGGTGAACAGGTATGGAATTTCGCCGATTTTGCGACCTCGCAAGGCATAT
TGCGCGTTGGCGGTAACAAGAAAGGGATCTTCACTCGCGACCGCAAACCGAAGTCGGCGGCTTT
TCTGCTGCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTGAAAAACCGCAGCAGGGAGGCAAACAA
TGAGACGTCCGGTAACCTTTAAACTGAGGGCACTGAAGTCGCTTGATGTGCTGAATTGTTTGTGA
TGTTGGTGGCGTATTTTGTTTAAATAAGTAAGCATGGCTGTGATTTTATCATATGATCGATCTTTG
GGGTTTTATTTAACACATTGTAAAATGTGTATCTATTAATAACTCAATGTATAAGATGTGTTCATT
CTTCGGTTGCCATAGATCTGCTTATTTGACCTGTGATGTTTTGACTCCAAAAACCAAAATCACAAC
TCAATAAACTCATGGAATATGTCCACCTGTTTCTTGAAGAGTTCATCTACCATTCCAGTTGGCATT
TATCAGTGTTGCAGCGGCGCTGTGCTTTGTAACATAACAATTGTTACGGCATATATCCAA

شكل ١٢ج

هوية متوالية رقم : ٥

CTGCAGAAGTAACACCAAACAACAGGGTGAGCATCGACAAAAGAAACAGTACCAAGCAAATAA
ATAGCGTATGAAGGCAGGGCTAAAAAAAATCCACATATAGCTGCTGCATATGCCATCATCCAAGT
ATATCAAGATCGAAATAATTATAAAACATACTTGTTTATTATAATAGATAGGTACTCAAGGTTAG
AGCATATGAATAGATGCTGCATATGCCATCATGTATATGCATCAGTAAAACCCACATCAACATGT
ATACCTATCCTAGATCGATATTTCCATCCATCTTAAACTCGTAACTATGAAGATGTATGACACAC
ACATACAGTTCCAAAATTAATAAATACACCAGGTAGTTTGAAACAGTATTCTACTCCGATCTAGA
ACGAATGAACGACCGCCCAACCACACCACATCATCACAACCAAGCGAACAAAAAGCATCTCTGT
ATATGCATCAGTAAAACCCGCATCAACATGTATACCTATCCTAGATCGATATTTCCATCCATCAT
CTTCAATTCGTAACTATGAATATGTATGGCACACACATACAGATCCAAAATTAATAAATCCACCA
GGTAGTTTGAAACAGAATTCTACTCCGATCTAGAACGACCGCCCAACCAGACCACATCATCACA
ACCAAGACAAAAAAAAAGCATGAAAAGATGACCCGACAAACAAGTGCACGGCATATATTGAAAT
AAAGGAAAAGGGCAAACCAAACCCTATGCAACGAAACAAAAAAAATCATGAAATCGATCCCGT
CTGCGGAACGGCTAGAGCCATCCCAGGATTCCCCAAAGAGAAACACTGGCAAGTTAGCAATCAG
AACGTGTCTGACGTACAGGTCGCATCCGTGTACGAACGCTAGCAGCACGGATCTAACACAAACA
CGGATCTAACACAAACATGAACAGAAGTAGAACTACCGGGCCCTAACCATGCATGGACCGGAAC
GCCGATCTAGAGAAGGTAGAGAGGGGGGGGGGGGGGAGGACGAGCGGCGTACCTTGAAGCGGA
GGTGCCGACGGGTGGATTTGGGGGAGATCTGGTTGTGTGTGTGTGCGCTCCGAACAACACGAGG
TTGGGGAGGTACCAAGAGGGTGTGGAGGGGGTGTCTATTTATTACGGCGGGCGAGGAAGGGAA
AGCGAAGGAGCGGTGGGAAAGGAATCCCCCGTAGCTGCCGGTGCCGTGAGAGGAGGAGGAGGC
CGCCTGCCGTGCCGGCTCACGTCTGCCGCTCCGCCACGCAATTTCTGGATGCCGACAGCGGAGCA
AGTCCAACGGTGGAGCGGAACTCTCGAGAGGGGTCCAGCCGCGGAGTATCGGAAGTTGAAGAC
AAAGAAGGTCTTAAATCCTGGCTAGCAACACTGAACTATGCCAGAAACCACATCAAAGCATATC
GGCAAGCTTCTTGGCCCATTATATCCAAAGACCTCAGAGAAAGGTGAGCGAAGGCTCAATTCAG
AAGATTGGAAGCTGATCAATAGGATCAAGACAATGGTGAGAACGCTTCCAAATCTCACTATTCC
ACCAGAAGATGCATACATTATCATTGAAACAGATGCATGTGCAACTGGATGGGGAGCAGTATGC
AAGTGGAAGAAAAACAAGGCAGACCCAAGAAATACAGAGCAAATCTGTAGGTATGCCAGTGGA
AAATTTGATAAGCCAAAAGGAACCTGTGATGCAGAAATCTATGGGGTTATGAATGGCTTAGAAA
AGATGAGATTGTTCTACTTGGACAAAAGAGAGATCACAGTCAGAACTGACAGTAGTGCAATCGA
AAGGTTCTACAACAAGAGTGCTGAACACAAGCCTTCTGAGATCAGATGGATCAGGTT

شكل ١٣أ

CATGGACTACATCACTGGTGCAGGACCAGAGATAGTCATTGAACACATAAAAGGGAAGAGCAAT
GGTTTAGCTGACATCTTGTCCAGGCTCAAAGCCAAATTAGCTCAGAATGAACCAACGGAAGAGA
TGATCCTGCTTACACAAGCCATAAGGGAAGTAATTCCTTATCCAGATCATCCATACACTGAGCAA
CTCAGAGAATGGGGAAACAAAATTCTGGATCCATTCCCCACATTCAAGAAGGACATGTTCGAAA
GAACAGAGCAAGCTTTTATGCTAACAGAGGAACCAGTTCTACTCTGTGCATGCAGGAAGCCTGC
AATTCAGTTAGTGTCCAGAACATCTGCCAACCCAGGAAGGAAATTCTTCAAGTGCGCAATGAAC
AAATGCCATTGCTGGTACTGGGCAGATCTCATTGAAGAACACATTCAAGACAGAATTGATGAAT
TTCTCAAGAATCTTGAAGTTCTGAAGACCGGTGGCGTGCAAACAATGGAGGAGGAACTTATGAA
GGAAGTCACCAAGCTGAAGATAGAAGAGCAGGAGTTCGAGGAATACCAGGCCACACCAAGGGC
TATGTCGCCAGTAGCCGCAGAAGATGTGCTAGATCTCCAAGACGTAAGCAATGACGATTGAGGA
GGCATTGACGTCAGGGATGACCGCAGCGGAGAGTACTGGGCCCATTCAGTGGATGCTCCACTGA
GTTGTATTATTGTGTGCTTTTCGGACAAGTGTGCTGTCCACTTTCTTTTGGCACCTGTGCCACTTTA
TTCCTTGTCTGCCACGATGCCTTTGCTTAGCTTGTAAGCAAGGATCGCAGTGCGTGTGTGACACC
ACCCCCCTTCCGACGCTCTGCCTATATAAGGCACCGTCTGTAAGCTCTTACGATCATCGGTAGTTC
ACCAAGGCCCGGGGTCGGATCTAGCTGAAGGCTCGACAAGGCAGTCCACGGAGGAGCTGATATT
TGGTGGACAAGCTGTGGATAGGAGCAACCCTATCCCTAATATACCAGCACCACCAAGTCAGGGC
AATCCCCAGATCACCCCAGCAGATTCGAAGAAGGTACAGTACACACACATGTATATATGTATGA
TGTATCCCTTCGATCGAAGGCATGCCTTGGTATAATCACTGAGTAGTCATTTTATTACTTTGTTTT
GACAAGTCAGTAGTTCATCCATTTGTCCCATTTTTTCAGCTTGGAAGTTTGGTTGCACTGGCCTTG
GTCTAATAACTGAGTAGTCATTTTATTACGTTGTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCC
ATTTTTTCAGCTAGGAAGTTTGGTTGCACTGGCCTTGGACTAATAACTGATTAGTCATTTTATTAC
ATTGTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCCATTTTTCAGCTAGGAAGTTC

شكل ١٣ب

هوية متوالية رقم : ٦

ATCGGAAGTTGAAGACAAAGAAGGTCTTAAATCCTGGCTAGCAACACTGAACTATGCCAGAAAC
CACATCAAAGCATATCGGCAAGCTTCTTGGCCCATTATATCCAAAGACCTCAGAGAAAGGTGAG
CGAAGGCTCAATTCAGAAGATTGGAAGCTGATCAATAGGATCAAGACAATGGTGAGAACGCTTC
CAAATCTCACTATTCCACCAGAAGATGCATACATTATCATTGAAACAGATGCATGTGCAACTGGA
TGGGGAGCAGTATGCAAGTGGAAGAAAAACAAGGCAGACCCAAGAAATACAGAGCAAATCTGT
AGGTATGCCAGTGGAAAATTTGATAAGCCAAAAGGAACCTGTGATGCAGAAATCTATGGGGTTA
TGAATGGCTTAGAAAAGATGAGATTGTTCTACTTGGACAAAAGAGAGATCACAGTCAGAACTGA
CAGTAGTGCAATCGAAAGGTTCTACAACAAGAGTGCTGAACACAAGCCTTCTGAGATCAGATGG
ATCAGGTTCATGGACTACATCACTGGTGCAGGACCAGAGATAGTCATTGAACACATAAAAGGGA
AGAGCAATGGTTTAGCTGACATCTTGTCCAGGCTCAAAGCCAAATTAGCTCAGAATGAACCAAC
GGAAGAGATGATCCTGCTTACACAAGCCATAAGGGAAGTAATTCCTTATCCAGATCATCCATAC
ACTGAGCAACTCAGAGAATGGGGAAACAAAATTCTGGATCCATTCCCCACATTCAAGAAGGACA
TGTTCGAAAGAACAGAGCAAGCTTTTATGCTAACAGAGGAACCAGTTCTACTCTGTGCATGCAG
GAAGCCTGCAATTCAGTTAGTGTCCAGAACATCTGCCAACCCAGGAAGGAAATTCTTCAAGTGC
GCAATGAACAAATGCCATTGCTGGTACTGGGCAGATCTCATTGAAGAACACATTCAAGACAGAA
TTGATGAATTTCTCAAGAATCTTGAAGTTCTGAAGACCGGTGGCGTGCAAACAATGGAGGAGGA
ACTTATGAAGGAAGTCACCAAGCTGAAGATAGAAGAGCAGGAGTTCGAGGAATACCAGGCCAC
ACCAAGGGCTATGTCGCCAGTAGCCGCAGAAGATGTGCTAGATCTCCAAGACGTAAGCAATGAC
GATTGAGGAGGCATTGACGTCAGGGATGACCGCAGCGGAGAGTACTGGGCCCATTCAGTGGATG
CTCCACTGAGTTGTATTATTGTGTGCTTTTCGGACAAGTGTGCTGTCCACTTTCTTTTGGCACCTGT
GCCACTTTATTCCTTGTCTGCCACGATGCCTTTGCTTAGCTTGTAAGCAAGGATCGCAGTGCGTGT
GTGACACCACCCCCCTTCCGACGCTCTGCCTATATAAGGCACCGTCTGTAAGCTCTTACGATCAT
CGGTAGTTCACCAAGGCCCGGGGTCGGATCTAGCTGAAGGCTCGACAAGGCAGTCCACGGAGGA
GCTGATATTTGGTGGACAAGCTGTGGATAGGAGCAACCCTATCCCTAATATACCAGCACCACCA
AGTCAGGGCAATCCCCAGATCA<u>CCCCAGCAGATTCGAAGAAG</u>gtacagtacacacacatgtatatatgtatgatgtatcc
cttcgatcgaaggcatgccttggtataatcactgagtagtcatttattacttgtttgacaagtcagtagttcatccatttgtcccatttttcagcttggaagtttggttgca
ctggccttggtctaataactgagtagtcatttattacgttgtttcgacaagtcagtagctcatccatctgtcccatttttcagctaggaagtttggttgcactggccttgga
ctaataactgattagtcatttattacattgtttcgacaagtcagtagctcatccatctgtcccatttttcag**CTAGGAAGTTC**

شكل ١٤

هوية متوالية رقم : ٧

AGCACTTAAAGATCTTTAGAAGAAAGCAAAGCATTTATTAATACATAACAATGTCCAGGTAGCC
CAGCTGAATTACAATACGCAACTGCTCATAATAATTCAACAAACCCAAGTAGTACACAACATCC
AGAAGCAAATAAAGCCCATACGTACCAAAGCCTACACAAGCAGCAACACTCACTGCCAGTGCCG
GTGGGTCTTTAAAGCACACGGGCCTTGACCACGCGATCCACCTTGAAACAAACTTGGTAAAATTA
AAGCAAACCAGAAGCACACACACGCCAACGCAACGCTTCTGATCGCGCGCCCAAGGCCCGGCCG
GCCAGAACGTACGACGGACACGCACACGCTGCGACCGAGCTCTAGGTGATTAAGCTAACTACTC
AAAGGTAGGTCTTGCGACAGTCAACAGCTCTGACAGTTTCTTTCAAGGACATGTTGTCTCTGTGG
TCTGTCACATCTTTGGAAAGTTTCACATGGTAAGACATGTGATGATACTCTGGAACATGAACTGG
ACCTCCACCAATGGGAGTGTTCATCTGGGTGTGGTCAGCCACTATGAAGTCGCCTTTGCTGCCAG
TAATCTCATGACAGATCTTGAAGGCTGACTTGAGACCGTGGTTGGCTTGGTCACCCCAGATGTAG
AGGCAGTGGGGAGTGAAGTTGAACTCCAAGTTCTTTCCCAACACATGACCATCTTTCTTGAAGCC
TTGACCATTGAGTTTGACCCTATTGTAGACAGACCCATTCTCAAAGGTGACTTCAGCCCTAGTCTT
GAAGTTGCCATCTCCTTCAAAGGTGATTGTGCGCTCTTGCACATAGCCATCTGGCATACAGGACT
TGTAGAAGTCCTTCAACTCTGGACCATACTTGGCAAAGCACTGTGCTCCATAGGTGAGAGTGGTG
ACAAGTGTGCTCCAAGGCACAGGAACATCACCAGTTGTGCAGATGAACTGTGCATCAACCTTTCC
CACTGAGGCATCTCCGTAGCCTTTCCCACGTATGCTAAAGGTGTGGCCATCAACATTCCCTTCCA
TCTCCACAACGTAAGGAATCTTCCCATGAAAGAGAAGTGCTCCAGATGCCATGGTGTCGTGTGG
ATCCGGTACACACGTGCCTAGGACCGGTTCAACTAACTACTGCAGAAGTAACACCAAACAACAG
GGTGAGCATCGACAAAAGAAACAGTACCAAGCAAATAAATAGCGTATGAAGGCAGGGCTAAAA
AAATCCACATATAGCTGCTGCATATGCCATCATCCAAGTATATCAAGATCGAAATAATTATAAAA
CATACTTGTTTATTATAATAGATAGGTACTCAAGGTTAGAGCATATGAATAGATGCTGCATATGC
CATCATGTATATGCATCAGTAAAACCCACATCAACATGTATACCTATCCTAGATCGATATTTCCA
TCCATCTTAAACTCGTAACTATGAAGATGTATGACACACACATACAGTTCCAAAATTAATAAATA
CACCAGGTAGTTTGAAACAGTATTCTACTCCGATCTAGAACGAATGAACGACCGCCCAACCACA
CCACATCATCACAACCAAGCGAACAAAAAGCATCTCTGTATATGCATCAGTAAAACCCGCATCA
ACATGTATACCTATCCTAGATCGATATTTCCATCCATCATCTTCAATTCGTAACTATGAATATGTA
TGGCACACACATACAGATCCAAAATTAATAAATCCACCAGGTAGTTTGAAACAGAATTCTACTCC
GATCTAGAACGACCGCCCAACCAGACCACATCATCACAACCAAGACAAAAAAAAGCATGAAAA
GATGACCCGACAAACAAGTGCACGGCATATATTGAAATAAAGGAAAAGGGCAAACCAAACCCT
ATGCAACGAAACAAAAAAAATCATGAAATCGATCCCGTCTGCGGAACGGCTAGAGCCATCCCAG
GATTCCCCAAAGAGAAACACTGGCAAGTTAGCAATCAGAACGTGTCTGACGTACAGGTCGCATC
CGTGTACGAACGCTAGCAGCACGGATCTAACACAAACACGGATCTAACACAAACATGAACAGAA
GTAGAACTACCGGGCCCTAACCATGCATGGACCGGAACGCCGATCTAGAGAAGGTAGAGAGGG
GGGGGGGGGGGAGGACGAGCGGCGTACCTTGAAGCGGAGGTGCCGACGGGTGGATTTGGGGGA
GATCTGGTTGTGTGTGTGCGCTCCGAACAACACGAGGTTGGGGAGGTACCAAGAGGGTGTGG
AGGGGGTGTCTATTTATTACGGCGGGCGAGGAAGGGAAAGCGAAGGAGCGGTGGGAAAGGAAT
CCCCCGTAGCTGCCGGTGCCGTGAGAGGAGGAGGAGGCCGCCTGCCGTGCCGGCTCACGTCTGC
CGCTCCGCCACGCAATTTCTGGATGCCGACAGCGGAGCAAGTCCAACGGTGGAGCGGAACT

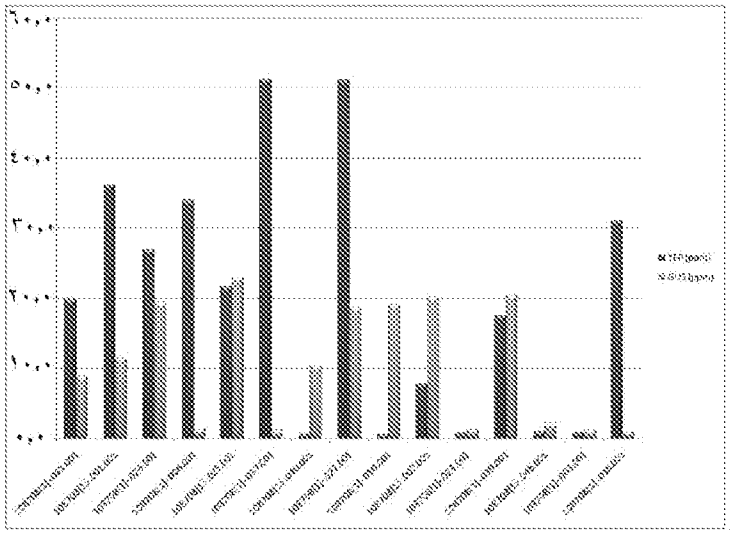
شكل ١٥أ

CTCGAGAGGGGTCCAGCCGCGGAGTATCGGAAGTTGAAGACAAAGAAGGTCTTAAATCCTGGCT
AGCAACACTGAACTATGCCAGAAACCACATCAAAGCATATCGGCAAGCTTCTTGGCCCATTATAT
CCAAAGACCTCAGAGAAAGGTGAGCGAAGGCTCAATTCAGAAGATTGGAAGCTGATCAATAGG
ATCAAGACAATGGTGAGAACGCTTCCAAATCTCACTATTCCACCAGAAGATGCATACATTATCAT
TGAAACAGATGCATGTGCAACTGGATGGGGAGCAGTATGCAAGTGGAAGAAAAACAAGGCAGA
CCCAAGAAATACAGAGCAAATCTGTAGGTATGCCAGTGGAAAATTTGATAAGCCAAAAGGAACC
TGTGATGCAGAAATCTATGGGGTTATGAATGGCTTAGAAAAGATGAGATTGTTCTACTTGGACAA
AAGAGAGATCACAGTCAGAACTGACAGTAGTGCAATCGAAAGGTTCTACAACAAGAGTGCTGAA
CACAAGCCTTCTGAGATCAGATGGATCAGGTTCATGGACTACATCACTGGTGCAGGACCAGAGA
TAGTCATTGAACACATAAAAGGGAAGAGCAATGGTTTAGCTGACATCTTGTCCAGGCTCAAAGC
CAAATTAGCTCAGAATGAACCAACGGAAGAGATGATCCTGCTTACACAAGCCATAAGGGAAGTA
ATTCCTTATCCAGATCATCCATACACTGAGCAACTCAGAGAATGGGGAAACAAAATTCTGGATCC
ATTCCCCACATTCAAGAAGGACATGTTCGAAAGAACAGAGCAAGCTTTTATGCTAACAGAGGAA
CCAGTTCTACTCTGTGCATGCAGGAAGCCTGCAATTCAGTTAGTGTCCAGAACATCTGCCAACCC
AGGAAGGAAATTCTTCAAGTGCGCAATGAACAAATGCCATTGCTGGTACTGGGCAGATCTCATT
GAAGAACACATTCAAGACAGAATTGATGAATTTCTCAAGAATCTTGAAGTTCTGAAGACCGGTG
GCGTGCAAACAATGGAGGAGGAACTTATGAAGGAAGTCACCAAGCTGAAGATAGAAGAGCAGG
AGTTCGAGGAATACCAGGCCACACCAAGGGCTATGTCGCCAGTAGCCGCAGAAGATGTGCTAGA
TCTCCAAGACGTAAGCAATGACGATTGAGGAGGCATTGACGTCAGGGATGACCGCAGCGGAGAG
TACTGGGCCCATTCAGTGGATGCTCCACTGAGTTGTATTATTGTGTGCTTTTCGGACAAGTGTGCT
GTCCACTTTCTTTTGGCACCTGTGCCACTTTATTCCTTGTCTGCCACGATGCCTTTGCTTAGCTTGT
AAGCAAGGATCGCAGTGCGTGTGTGACACCACCCCCCTTCCGACGCTCTGCCTATATAAGGCACC
GTCTGTAAGCTCTTACGATCATCGGTAGTTCACCAAGGCCCGGGGTCGGATCTAGCTGAAGGCTC
GACAAGGCAGTCCACGGAGGAGCTGATATTTGGTGGACAAGCTGTGGATAGGAGCAACCCTATC
CCTAATATACCAGCACCACCAAGTCAGGGCAATCCCCAGATCACCCCAGCAGATTCGAAGAAGG
TACAGTACACACACATGTATATATGTATGATGTATCCCTTCGATCGAAGGCATGCCTTGGTATAA
TCACTGAGTAGTCATTTTATTACTTTGTTTTGACAAGTCAGTAGTTCATCCATTTGTCCCATTTTTT
CAGCTTGGAAGTTTGGTTGCACTGGCCTTGGTCTAATAACTGAGTAGTCATTTTATTACGTTGTTT
CGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCCCATTTTTTCAGCTAGGAAGTTTGGTTGCACTGGCCTT
GGACTAATAACTGATTAGTCATTTTATTACATTGTTTCGACAAGTCAGTAGCTCATCCATCTGTCC
CATTTTTCAGCTAGGAAGTTCGCGGCCGCAGGGCACCATGGTCCGTCCTGTAGAAACCCCAACCC
GTGAAATCAAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTCAGTCTGGATCGCGAAAACTGTGGAATTGA
TCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGTTTTAAC
GATCAGTTCGCCGATGCAGATATTCGTAATTATGCGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGAAGTCTT
TATACCGAAAGGTTGGGCAGGCCAGCGTATCGTGCTGCGTTTCGATGCGGTCACTCATTACGGCA
AAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTGATGGAGCATCAGGGCGGCTATACGCCATTTGAAGCCGA
TGTCACGCCGTATGTTATTGCCGGGAAAAGTGTACGTATCACCGTTTGTGTGAACAACGAACTGA
ACTGGCAGACTATCCCGCCGGGAATGGTGATTACCGACGAAAACGGCAAGAAAAAGCAGTCTTA
CTTCCATGATTTCTTTAACTATGCCGGAATCCATCGCAGCGTAATGCTCTACACCACGCCGAACA
CCTGGGTGGACGATATCACCGTGGTGACGCATGTCGCGCAAGACTGTAACCACG

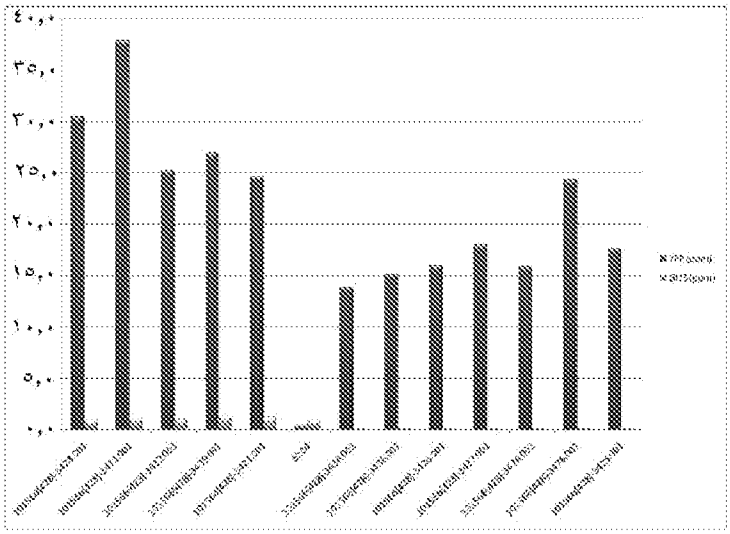
شكل ١٥ب

CGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGGCCAATGGTGATGTCAGCGTTGAACTGCGTGATGCGGATCAA
CAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCACTAGCGGGACTTTGCAAGTGGTGAATCCGCACCTCTGGC
AACCGGGTGAAGGTTATCTCTATGAACTGTGCGTCACAGCCAAAAGCCAGACAGAGTGTGATAT
CTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAGTTCCTGATTAACCACA
AACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCGGACTTGCGTGGCAAAGGATTCGAT
AACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGGATTGGGGCCAACTCCTACCGTACCTC
GCATTACCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGGGCAGATGAACATGGCATCGTGGTGATTGAT
GAAACTGCTGCTGTCGGCTTTAACCTCTCTTTAGGCATTGGTTTCGAAGCGGGCAACAAGCCGAA
AGAACTGTACAGCGAAGAGGCAGTCAACGGGGAAACTCAGCAAGCGCACTTACAGGCGATTAA
AGAGCTGATAGCGCGTGACAAAAACCACCCAAGCGTGGTGATGTGGAGTATTGCCAACGAACCG
GATACCCGTCCGCAAGGTGCACGGGAATATTTCGCGCCACTGGCGGAAGCAACGCGTAAACTCG
ACCCGACGCGTCCGATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGATACCATCAGC
GATCTCTTTGATGTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCAAAGCGGCGATTTGGA
AACGGCAGAGAAGGTACTGGAAAAAGAACTTCTGGCCTGGCAGGAGAAACTGCATCAGCCGATT
ATCATCACCGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACTCAATGTACACCGACATGTGGA
GTGAAGAGTATCAGTGTGCATGGCTGGATATGTATCACCGCGTCTTTGATCGCGTCAGCGCCGTC
GTCGGTGAACAGGTATGGAATTTCGCCGATTTTGCGACCTCGCAAGGCATATTGCGCGTTGGCGG
TAACAAGAAAGGGATCTTCACTCGCGACCGCAAACCGAAGTCGGCGGCTTTTCTGCTGCAAAAA
CGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTGAAAAACCGCAGCAGGGAGGCAAACAATGAGACGTCCGGT
AACCTTTAAACTGAGGGCACTGAAGTCGCTTGATGTGCTGAATTGTTTGTGATGTTGGTGGCGTA
TTTTGTTTAAATAAGTAAGCATGGCTGTGATTTTATCATATGATCGATCTTTGGGGTTTTATTTAA
CACATTGTAAAATGTGTATCTATTAATAACTCAATGTATAAGATGTGTTCATTCTTCGGTTGCCAT
AGATCTGCTTATTTGACCTGTGATGTTTTGACTCCAAAAACCAAAATCACAACTCAATAAACTCA
TGGAATATGTCCACCTGTTTCTTGAAGAGTTCATCTACCATTCCAGTTGGCATTTATCAGTGTTGC
AGCGGCGCTGTGCTTTGTAACATAACAATTGTTACGGCATATATCCAA

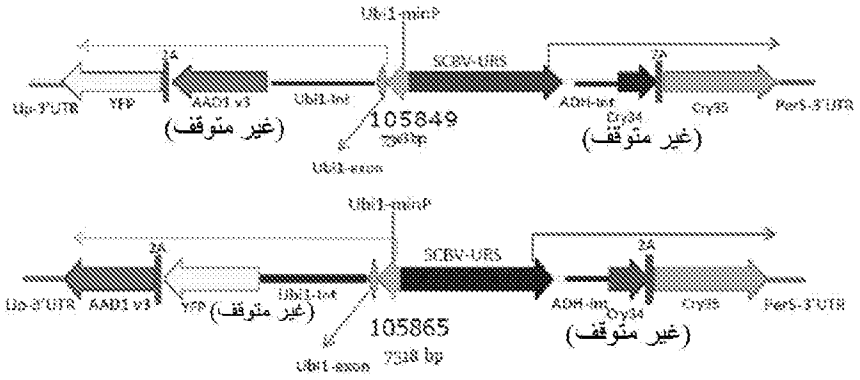
شكل ١٥ج



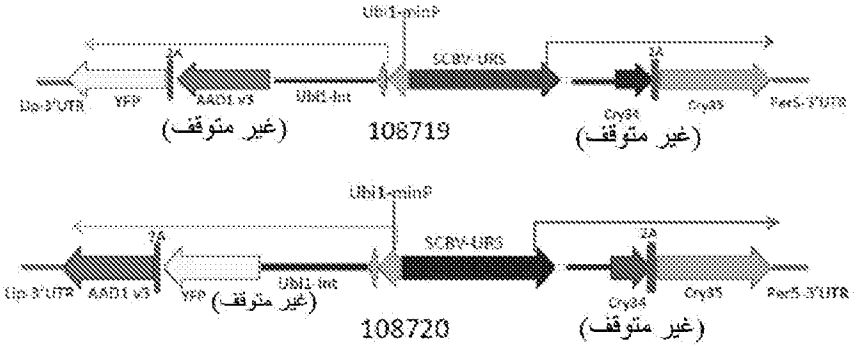
شكل ١٦



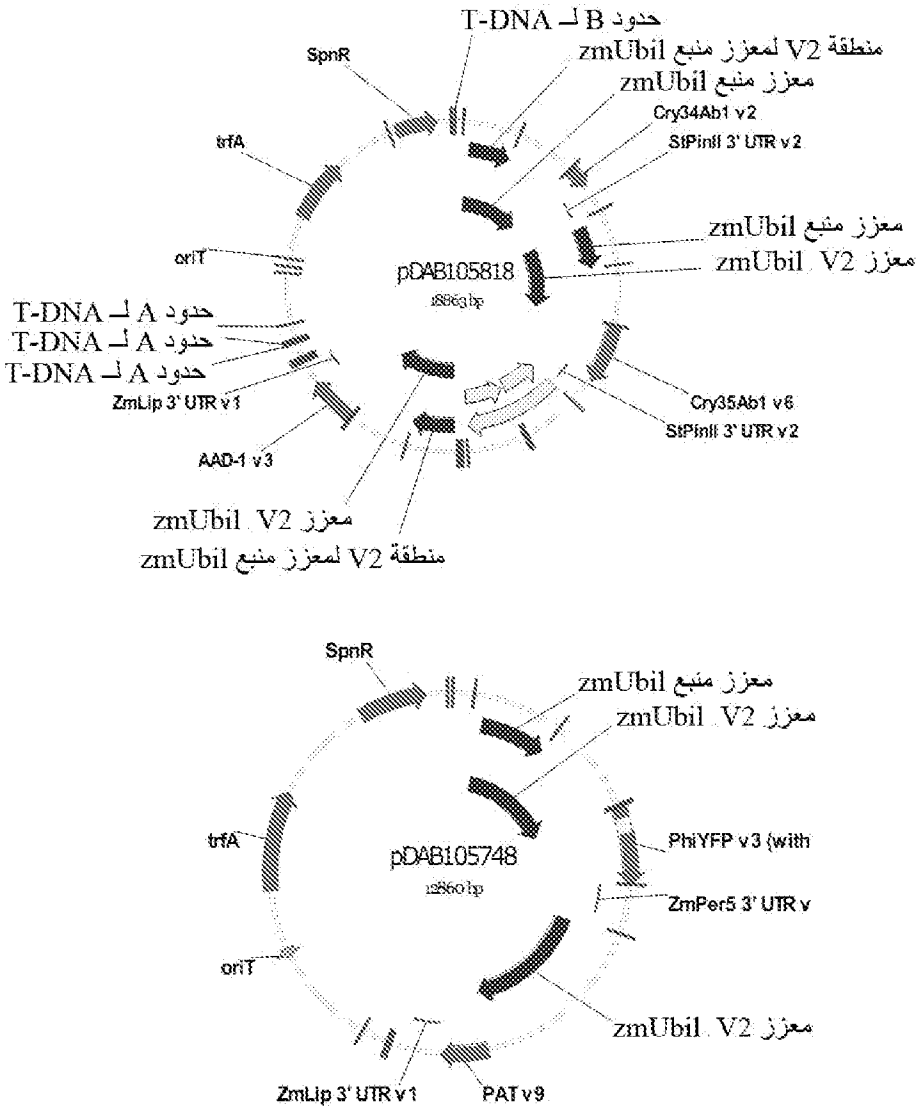
شكل ١٧


Ubi1-minP
SCBV-UBS
Ubi-3'UTR
YFP
AAD1 v3
Ubi1-Int
105849
7338 bp
Ubi1-exon
ADH-Int
Cry34
Cry35
Per5-3'UTR
(غير متوقف)
(غير متوقف)
105865
7338 bp

شكل ١٨


Ubi1-minP
SCBV-UBS
Ubi-3'UTR
YFP
AAD1 v3
Ubi1-Int
(غير متوقف)
108719
Cry34
Cry35
Per5-3'UTR
(غير متوقف)
108720
(غير متوقف)

شكل ١٩


T-DNA ـل B حدود
منطقة V2 لمعزز منبع zmUbil
معزز منبع zmUbil
Cry34Ab1 v2
StPinII 3' UTR v2
معزز منبع zmUbil
معزز V2 zmUbil
pDAB105818
13863 bp
Cry35Ab1 v6
StPinII 3' UTR v2
AAD-1 v3
ZmLip 3' UTR v1
T-DNA ـل A حدود
T-DNA ـل A حدود
T-DNA ـل A حدود
oriT
trfA
SpnR
معزز V2 zmUbil
منطقة V2 لمعزز منبع zmUbil
SpnR
معزز منبع zmUbil
معزز V2 zmUbil
PhiYFP v3 (with
ZmPer5 3' UTR v
pDAB105748
12860 bp
معزز V2 zmUbil
trfA
oriT
ZmLip 3' UTR v1
PAT v9

شكل ٢٠

هوية متوالية رقم : ١٦

CTGGACCCCTCTCGAGTGTTCCGCTTCACCGTTGGACTTGCTACGCTGTCAGCATCGAGATGTT
GCGTGGCGGAGCGGCAGACTTGAGCCGTCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCATC
TGTAGCTACGGGGGATTCCTTTCGCACCGCTCGTTCGCTTTCCCTTCCTCGTCTGCCGAAATAAT
GTTACACCCCCTCCACAGCCTCT

SEQ ID NO: 17
CTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTAGCTCTGCTGTCGGCATCCAGAAAAT
GCTTGGCAGTGCGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGGGGCCTCCTCCTGCTCTCACGGCACA
TGAAGCTACGGGTGATAGCTTGCCCACCGCTCCAACGCTTTCCCTTACTCTCACGCCGTAATAA
ATAGACACCCCTTCCACAACCTCT

SEQ ID NO: 18
CTGGACCTCTCTCGAGAGTTGCGCTCCACCGATGGACTTGCTCCGCTGTCGGCGTCCATAATTT
GCGTGGCGGAGCGGCAGACGGGAGCCGGCACGGCAGGGAGCCTCGTCCTCCTCTCACGGCACC
TGCAACTACGGGGGATTCCTATCCCACCGCTCCTTCGCTTTCACTTCTTCGCCCTCCTTAATAAG
TAGACACCCCATCCGAGCCCTCT

SEQ ID NO: 19
CAAGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCACCACCGTTGGACGTGCTCCGCTATCTGCATCCAGAAATT
GCGTGGCGGAACGGTAAACGTGAGCCGTCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGACACC
GGCAGCTACGGGGGATACCTGTCACACAGCTCCTTCGCTTTTCTTTCCTCGCCCGCCGTAATAT
GTATACACTCCCTCCGCACCCTCT

SEQ ID NO: 20
CTGGACCCCTCTCGAGGGTTCCGTTCCACCGTTGGTCTTGGTCCGCTGTCGGGATCCAGAAATA
GCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGATCCGGCACGGCATGCGGCCTCCTAGTCCTATCACAGCACC
GGCAGCTATGGGAGATTCCATTCCCACCGCTCCTGCGCTTTCACTGGCTGGCCCGCCGTGATAG
ATAGACACCCCCTCCACACCCTCT

شكل ٢١أ

هوية متوالية رقم : ٢١

GTTGGCTTCTCTTGTGAGTTCTGCTTCACGGATGGACTTGGTCAACGGACGGCATCCAGAATTT
GCGTGGCGTAGCGGCGGACGTGATCCGGCGCGGCAGGCGGCTTCCTCCTCCTCTCACTTAAGC
GACAGCTACAGGGGATTCCTTTCCCACCGCTCCTTCGCTTGCCGTACCTCGCCCGCCGTAATAA
ATAGACACCCCTTCCACTCCCTCT

SEQ ID NO: 22
CTGGATCCCTCTCGAGAGTGCGGCTCCGACGTTGGACTTGCTCCGAAGTCGGCATCCAAAAATT
GCGTGGTGGAGAGGCAGACTTGAGCCGGCACGGCAGGAGGCCTCGTCCTACTCGCACGGTATC
GGCAGCAACGGGAGAATCCTTGCACTCTGCTCCTTCGCTGTACCTTCCTCGCCCGCTGATATTG
ATAGACACCCCCTGCATACCCTCT

SEQ ID NO: 23
ATGGACCCTTCTCGAGTGTTCGGCTCCACCGTTAGACTTGCTCCACGATCGACATCAAGAAATT
GCGAGACGGAGCTACAAACGTAAGAAATCTCGGTAGGGGGCCTCCTCCTCCTCTCACGGCACC
GGCAGCTACGGGGGATTCCTGTCCCACCTCTCCTTCACGTTCCCTACCTCGCCCGCCATAATTA
ATAAGCACCCCCTCCGCACCCTCT

SEQ ID NO: 24
CTGGACCCCTCTAAAGAGTTCCACGCCACCGTTATAATGGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATT
ACTTGGCGGATCAGCAGACGTGAGCCAGCATGGCTGGCGGCCTCCTCCTCCTCTCACGATGCCG
TCAGCTACGGGGGGATTCCTTTCCCAACGCTCCTTCGCTTTCCTATGCGCGCCTGCCGGATTAAAT
AGGCAGCTTCTCGTCACCCTCT

SEQ ID NO: 25
CAAGACACCTCTCGATTGTTCCGCTTCACCGTTGGACTTTCTCCTCAGTCGGCATACAGAAATT
GCTTGGCGAAGCGGCAGACATGAGCCGGCACGACATGCGTCCTCATTCTCCTCTCATGGCACC
GGCAGTTACTGGTGAATCCTATCGCACCGCTCCTTCGCTGTCCCTTAATCGCCCGCCGAAAATA
ATTGACACCCCATCCACACCCTCT

شكل ٢١ب

هوية متوالية رقم : ٢٦

GAGGACCCCTCTCGTGTGTATCGCTCCACCTTTGGAGTTGGTCCACTATCGGCGTACAGAAAAT
TCGTTGCGAAGCGGCAGACGTGAGCCTACACGGCAGTCGGCCTCTACCTCCTGACAAGGCACG
TGCAGCTACAGATGATGCCTTTCCCACCACTCCTTCGCGTTCCTTTCCTCGCCATCAGTAATGAA
TGGACACGTCCTCCAGACTCTCT

SEQ ID NO: 27
CTGAACCCATCTCGAGTATGCCGCACGATCGATTGACATGCTCCACTGGCAGCATCCAGAAATT
GCATTGGGGAGCATCAGGCGTGAGCCTGCACGGCAGGCGGACTATTCCTCCTCGCGCGGCACC
GGCAACTACGGGGGATGCTTGACCGACCGCTCCATCGATTTCCCAATCTCGCTTGCCGTATTAA
ATAGATAACCCCTTCACACCCTCT

SEQ ID NO: 28
CTGGACTCCTTACGGGAGATCCGCTCCACCGTTGGACTAGCTCCGTTTTCGGCTTCAATAAAGG
GCGTGGGGGAGCGGCAGTCGGGGGCAGGCACGGCAGTGGTCCTCATCCATATCTCACGGGGCC
GGCAGTTGAGGGGGATTCCTGTCCCACCTCACCTACTCTTTCCCTACCTCGTCTGCCATATTAAA
TAGTCACCCCCTCCACAACCTTT

SEQ ID NO: 29
TTGGACCCCTCTCGAAAGTTAGGCTCCGCCGTTGGACTGGTTTCGCGGTCATCAATCAGGAATT
GCGGGGCGGAGGGTCAGACGTGTGCCGGCACAGCAGGTGGCCTCCTCATCGTCACAAGGCACT
GGCAACTACGGGTGATTCATTTCCTTCAGCACCTACGCTTACCCTGCCACGCCCTCCGTATTAT
AATGACACCCCCTCCACACCTTAT

SEQ ID NO: 30
CTGGACCCCACGCGGGGTTTTCGTTCCTCCGTTGGGATAGCTCCGGTGTCAGCATACAGAGAAT
ATATGTCGGAGCGGAAGACGTGAGCCGACACGGCGGGCTGCCGCCTCCTCCTGTCACGACACC
GGCAGGTACGGGGGATTCCGTTCCCGCCGCACAGTCACTTTCGCTTCCTTGCCGGTCGTATTAA
ATAGACACCGTGTCCACAGCCTCT

شكل ٢١ج

هوية متوالية رقم : ٣١

CTTGAGCCCACTCTAGAGTTCCGTTTCACCGAATGACTAGCTCCGCTGTCGGTATCCATTAAGT
GGGAGGCAGAACGTCATATGAGAGTCGGCACGGGAGGCGTTCGCCACGTCCGCGCACTACAGC
GGGAGCTGCGGAATATACCTGTCCCAATGCTGCTACGCTTTCCCTTCCGCGCCCACCGTAGAAA
AATGACAGTCCCTTCACACCCTCT

SEQ ID NO: 32
TAGGAGGCCTCTCGAAAGGTCCGGAACTCCGTAGGACGTGCTCCGCTGACAGCATCCAGGAAT
ATCATGGGGGAGCTGCAGACGAGAGCCTGGACGACAAGGGGTCACCTCGGCCGCTGACAGCT
GCGGCAGCAACGGAGTATGCTTTTCTCACCGCTCCGGCGCTTTCCCTTCGACGCAGGCCAGAAT
AAGTAGACATCAGCGCCACACCCTCT

SEQ ID NO: 33
CTTGTCTCCACTCTGATGTTCCGCTCCAACATTTGATTTGCTCCTCTGTAGGCATACAGTTATTG
GGGGACTGATCGGCAGACGTGAGCCAGCACTGCAAACGGCCAACTCCTCCTCTCTCGACTAAG
GGATTAATTAAGGATACCTTACCCGCGGCTCCTTCTCTTTCCCTACCTAGCCCGCCTTATTAAAT
AGAGACCGCCTCCACAGCCGCT

SEQ ID NO: 34
CTGTACCCTTCACAAGGGTTACACGCTACCGATGGACTTGCACCACTGTGGGGTTCCAATAATT
GCGTGGCTGGGCGTCAGACATATTCCGGCATGGCAAGCGGCCTGCTCCTCCTCTGGGAGCACC
GGCAACAATGGGGGATTCCAAGCCCGCAGGTCCTTCGTTTTACCGTCCTCGCCCGCCGTAGTAT
GTAGGCATCCCAGAGACTACCTCT

SEQ ID NO: 35
CAGGAACCCTAACGAGGGTTCCGCACGACCAAATGACTTGATCTTCTGTCGGCATCCAGAAAT
GGGGTGTCAGAGCGGCATGCGTGAGCCGGCGGGGCGTGCGGCCTCATGCTGCTCTCGCGGGAC
TAGGAGTTACGGGGGATACCTGTATTGCCGCTCCGACACTGTACCATCCTCTCCCGCCGGAGTA
TAGAGACACCCCCTCGACGCCATAT

شكل ٢١د

هوية متوالية رقم : ٣٦

CTGTGCTCCTGTATGGGGTTCAACTCCACCGTGAAATTTGCGCCTCTGTCGTCATCCAGAAATT
GCGTGGTTGATCTGCTGACGTTAAAGGGCTCTGCAGGCGGCTTCCTTCGGCTATGAAGGTACTG
GCGTCTGCAAGTGATGCTTTTGCTAACTCGCCTTCGATGTCCCTTCCTCGCGTGCTTTAATAGGT
TGTCAGCCGCTCCAGACCATTT

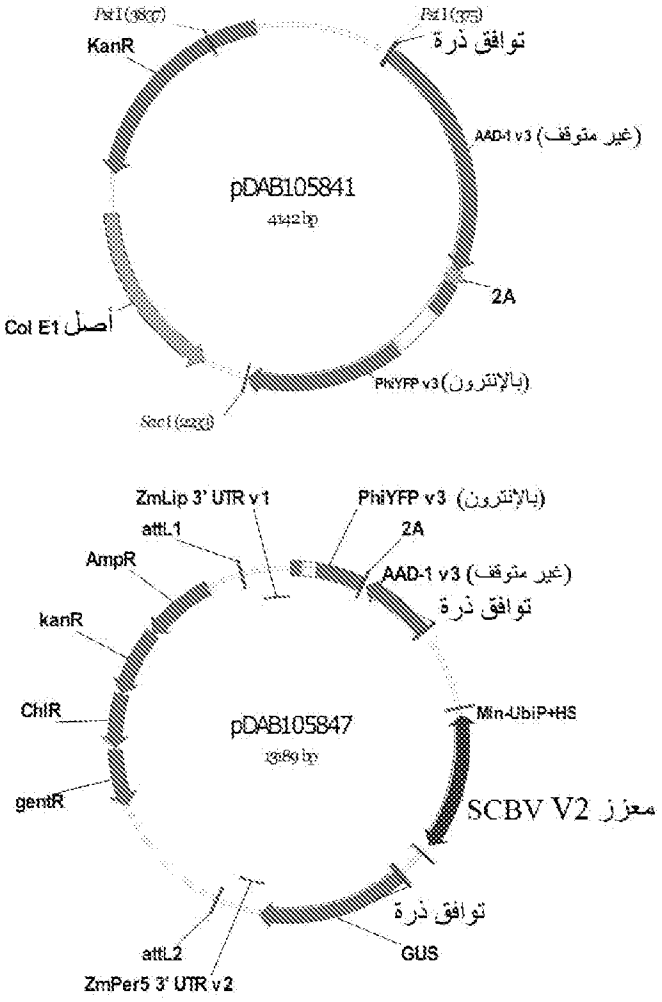
SEQ ID NO: 37
CTGGTCCCATCGCTAGTGGTACGCTCCACCGGTGGAGTAGCTCAGATGTCTGAAGGGTGGAATT
TAGAGGTGGAGAGACAGACGTGAGCTAGAGCGGCATGGGACCTGGTCCACCGCTCGAGGCAA
TGGCAACGACTGTTGAAACCTTGCCCACCACTCCTGCAATTTTCCATCCTCACCGGCCGGAATG
AATTAAAACCCACGTCACAACCTCT

SEQ ID NO: 38
CGTGACAGGGCTCGGGTGTTCGGCTCCATCGTAGTGCATGCGCCGATGTAAGTATACAAGAAG
TACGTGGCTTGGCGTCTGACGAGGGCCGTCAAGGCAGGCGGCCTCCTTCTAAGCTTACGGCGC
CGGCAGGTTCGTAGGTTACCTTACACTCAACTCATAGTCTATCTATTACTCGTACTGCGTTATAA
ATTGTCACCCCCTCCACACCCTCT

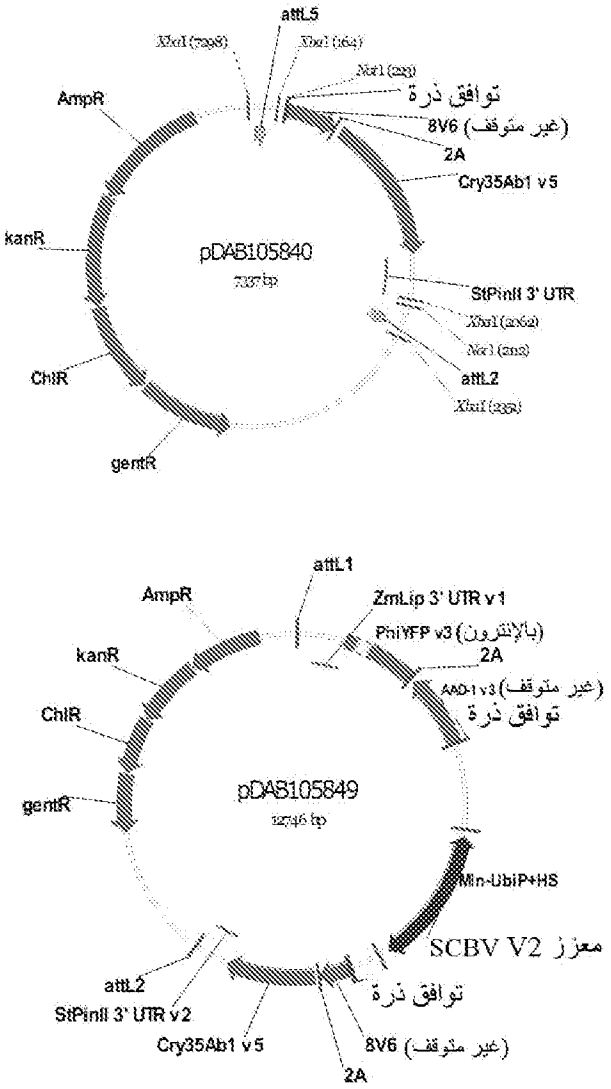
SEQ ID NO: 39
AGGAACGCTTCTCGATGGTTGCGCACATAGGAGGGACTTGATAGTCGGTGGAAATCTAAGAAT
TGCATATCAGATCTGCAGACGTTAGCCGACATGGCTAGCAGACTACTCCGCTTCACACGTCAGC
GAAAGCGACGGAGGATTTCTTGCCAACGGCGCCTTCGCGAACCCTTCCTCGCCCGTCGGAAGA
AAGATACTCCCCTTGCACACCCTCT

SEQ ID NO: 40
CTTGACTTGGCTCGAGAGTTCTGCGCTTCCATTGTAGTTGCAGCGATGTCGGAGTCCGAGGGTT
GCGTGGCGGTGCGGCAGACGTGGGCAGATACGACTGTATGCCAGCACCTAAACATACGGTACC
AGAAGCTGCGGTGGATACCTTTCCCGACGCATATACGTTTTCCGTGCCTCTCACGCCGTAGTAA
ATAAACTCCCCCTCCTGTTCCTTT

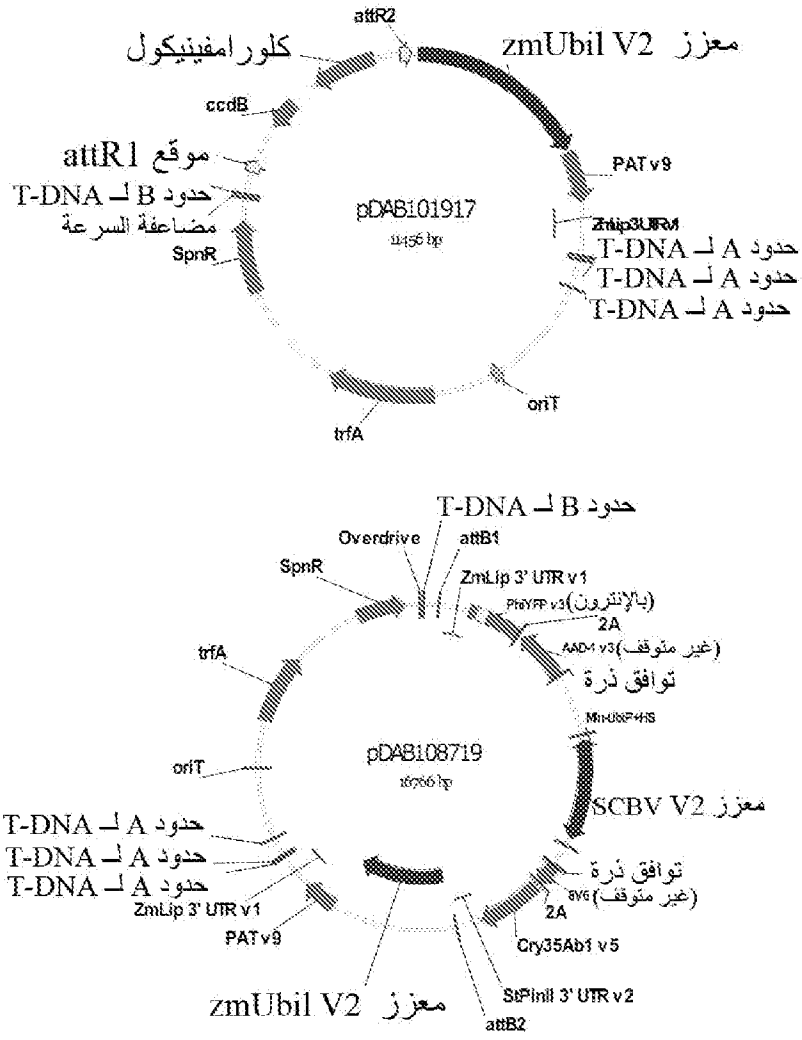
شكل ٢١هـ


KanR
توافق ذرة
AAD-1 v3 (غير متوقف)
pDAB105841
4142 bp
2A
أصل Col E1
PhiYFP v3 (بالإنترون)
ZmLip 3' UTR v1
PhiYFP v3 (بالإنترون)
attL1
2A
AmpR
AAD-1 v3 (غير متوقف)
توافق ذرة
kanR
ChlR
pDAB105847
Mln-UbiP+HS
معزز SCBV V2
gentR
توافق ذرة
attL2
GUS
ZmPer5 3' UTR v2

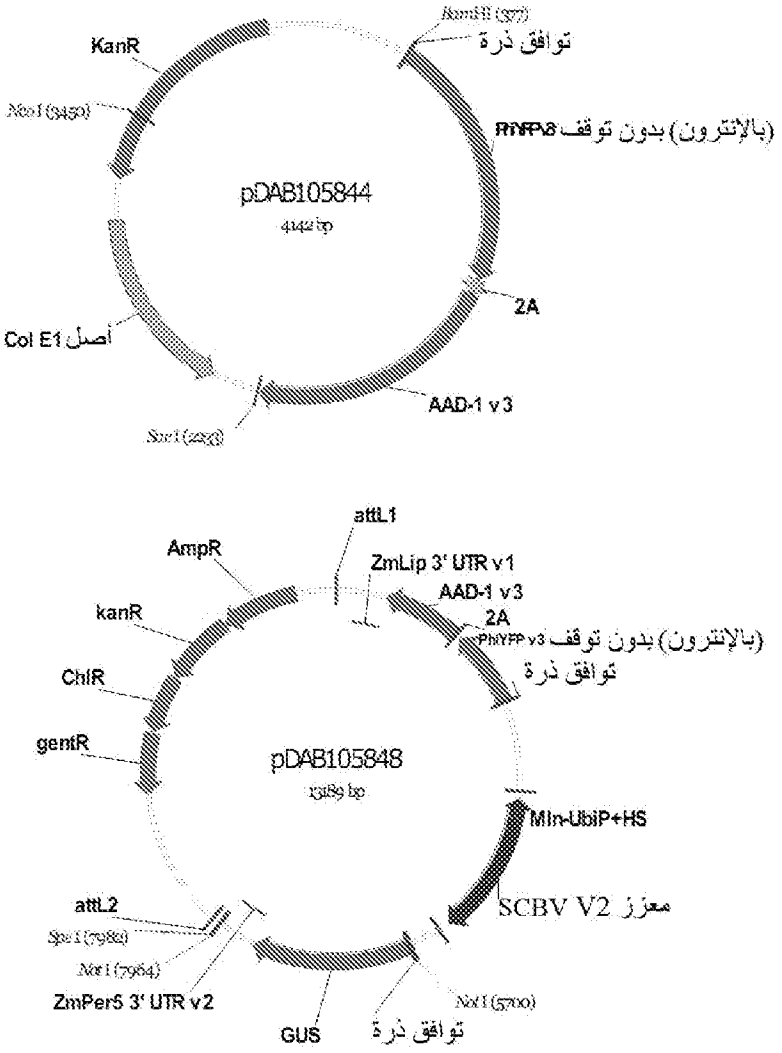
شكل ٢٢


attL5
AmpR
توافق ذرة
8V6 (غير متوقف)
2A
Cry35Ab1 v5
kanR
pDAB105840
StPinII 3' UTR
attL2
ChlR
gentR
attL1
AmpR
ZmLip 3' UTR v1
PhiYFP v3 (بالإنترون)
2A
kanR
توافق ذرة
ChlR
pDAB105849
gentR
Mln-UbiP+HS
معزز SCBV V2
attL2
توافق ذرة
StPinII 3' UTR v2
Cry35Ab1 v5
8V6 (غير متوقف)
2A

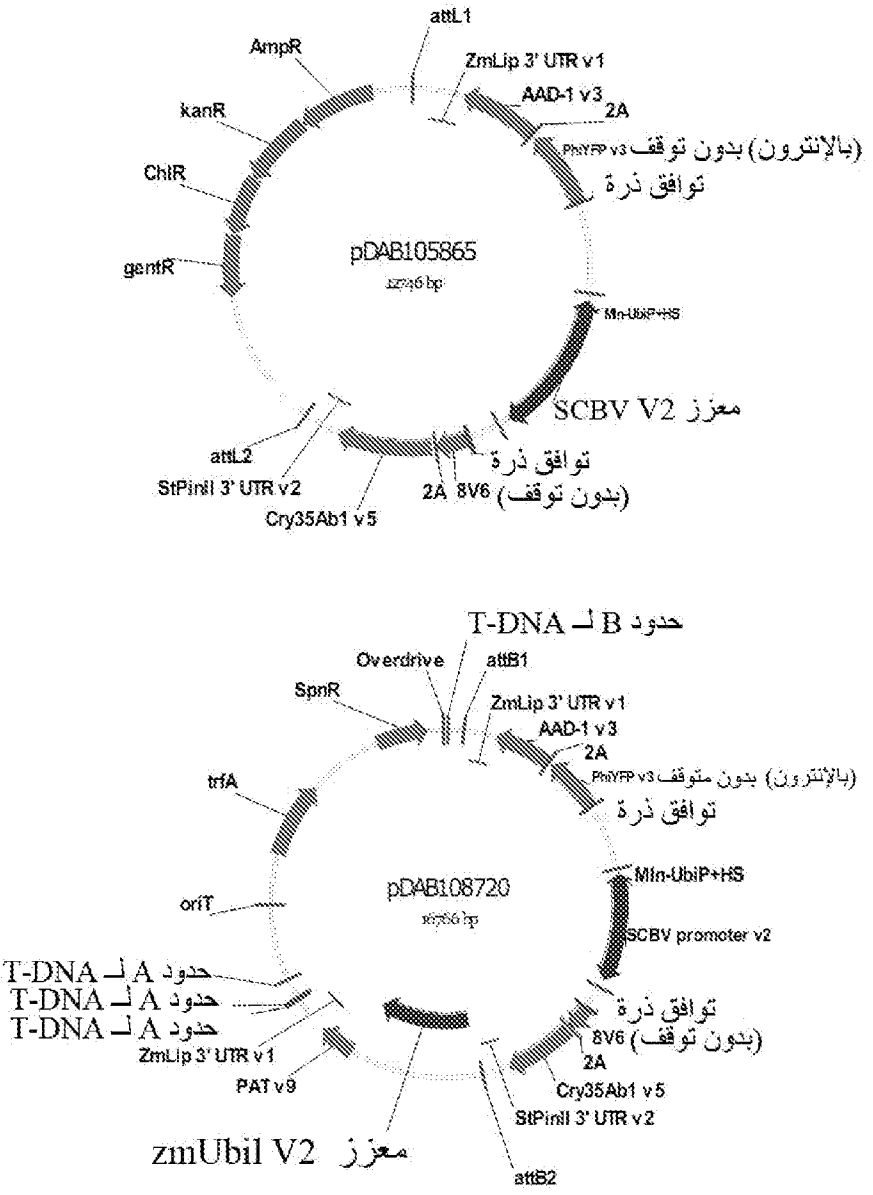
شكل ٢٣


attR2
كلورامفينيكول
معزز zmUbil V2
ccdB
attR1 موقع
T-DNA لـ B حدود
مضاعفة السرعة
SpnR
pDAB101917
11456 bp
PAT v9
ZmLip3UTR v1
T-DNA لـ A حدود
T-DNA لـ A حدود
T-DNA لـ A حدود
oriT
trfA
T-DNA لـ B حدود
Overdrive
attB1
SpnR
ZmLip 3' UTR v1
PhiYFP v3(بالإنترون)
2A
AAD-1 v3(غير متوقف)
توافق ذرة
MmUbiP4HS
trfA
pDAB108719
16966 bp
oriT
معزز SCBV V2
T-DNA لـ A حدود
T-DNA لـ A حدود
T-DNA لـ A حدود
توافق ذرة
SV6(غير متوقف)
2A
ZmLip 3' UTR v1
PAT v9
Cry35Ab1 v5
معزز zmUbil V2
StPinII 3' UTR v2
attB2

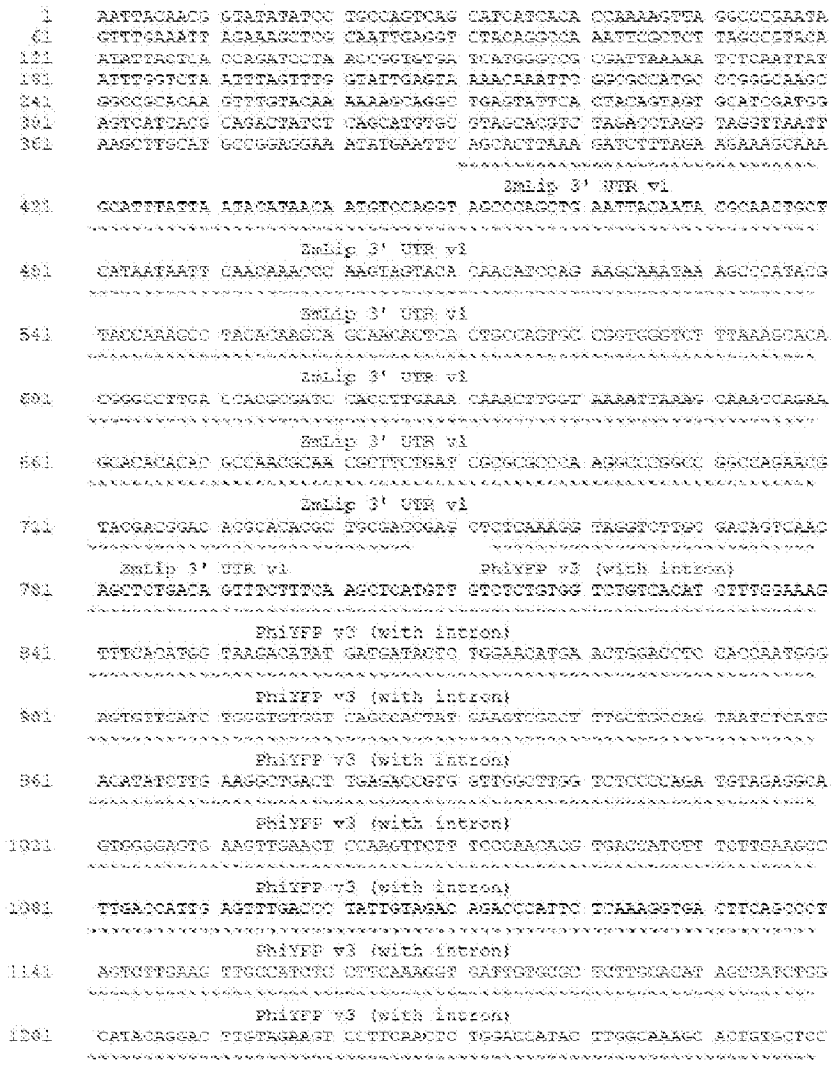
شكل ٢٤


KanR
توافق ذرة
(بالإنترون) بدون توقف
pDAB105844
2A
Col E1 أصل
AAD-1 v3
attL1
AmpR
ZmLip 3' UTR v1
AAD-1 v3
kanR
2A
(بالإنترون) بدون توقف
توافق ذرة
ChlR
gentR
pDAB105848
MIn-UbiP+HS
معزز SCBV V2
attL2
ZmPer5 3' UTR v2
GUS
توافق ذرة

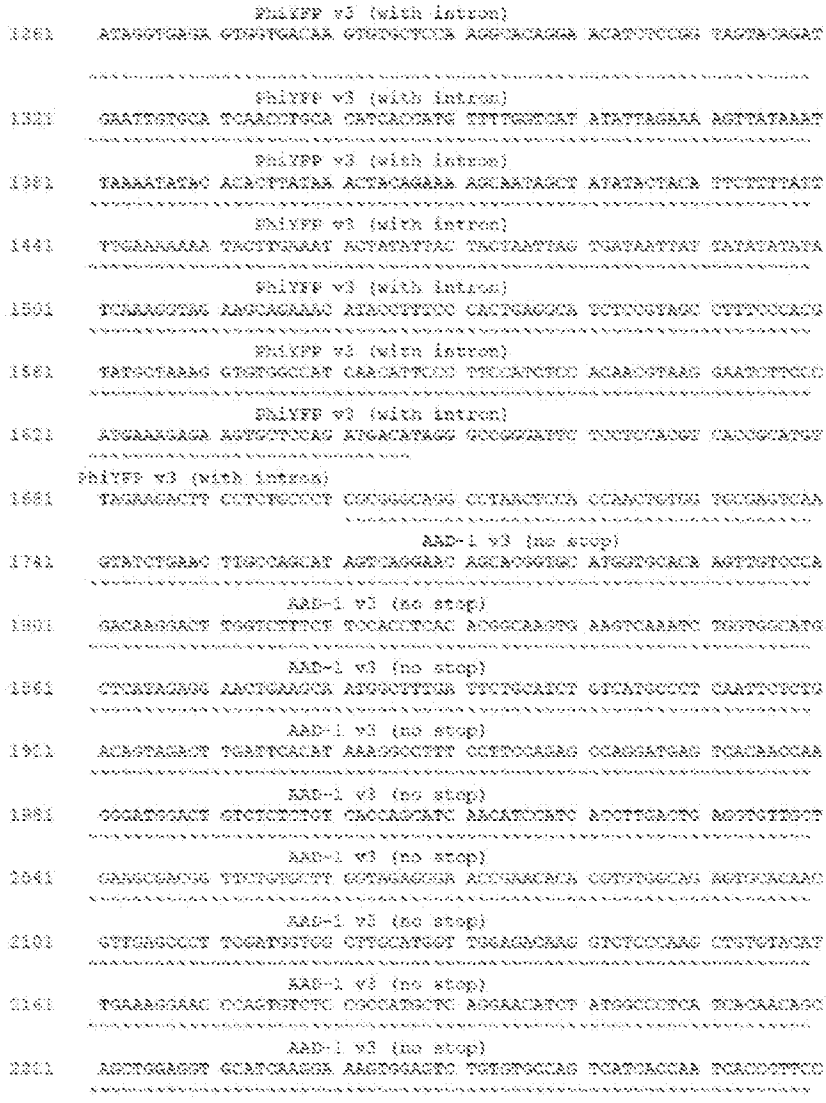
شكل ٢٥


attL1
AmpR
ZmLip 3' UTR v1
AAD-1 v3
2A
kanR
(بالإنترون) بدون توقف PhiYFP v3
توافق ذرة
ChlR
pDAB105865
gentR
Mln-UbiP+HS
معزز SCBV V2
attL2
StPinII 3' UTR v2
Cry35Ab1 v5
2A
8V6
توافق ذرة
(بدون توقف)
حدود T-DNA لـ B
Overdrive
attB1
SpnR
ZmLip 3' UTR v1
AAD-1 v3
2A
(بالإنترون) بدون متوقف PhiYFP v3
توافق ذرة
trfA
Mln-UbiP+HS
pDAB108720
oriT
SCBV promoter v2
حدود T-DNA لـ A
حدود T-DNA لـ A
حدود T-DNA لـ A
توافق ذرة
8V6
(بدون توقف)
2A
ZmLip 3' UTR v1
Cry35Ab1 v5
PAT v9
StPinII 3' UTR v2
معزز zmUbil V2
attB2

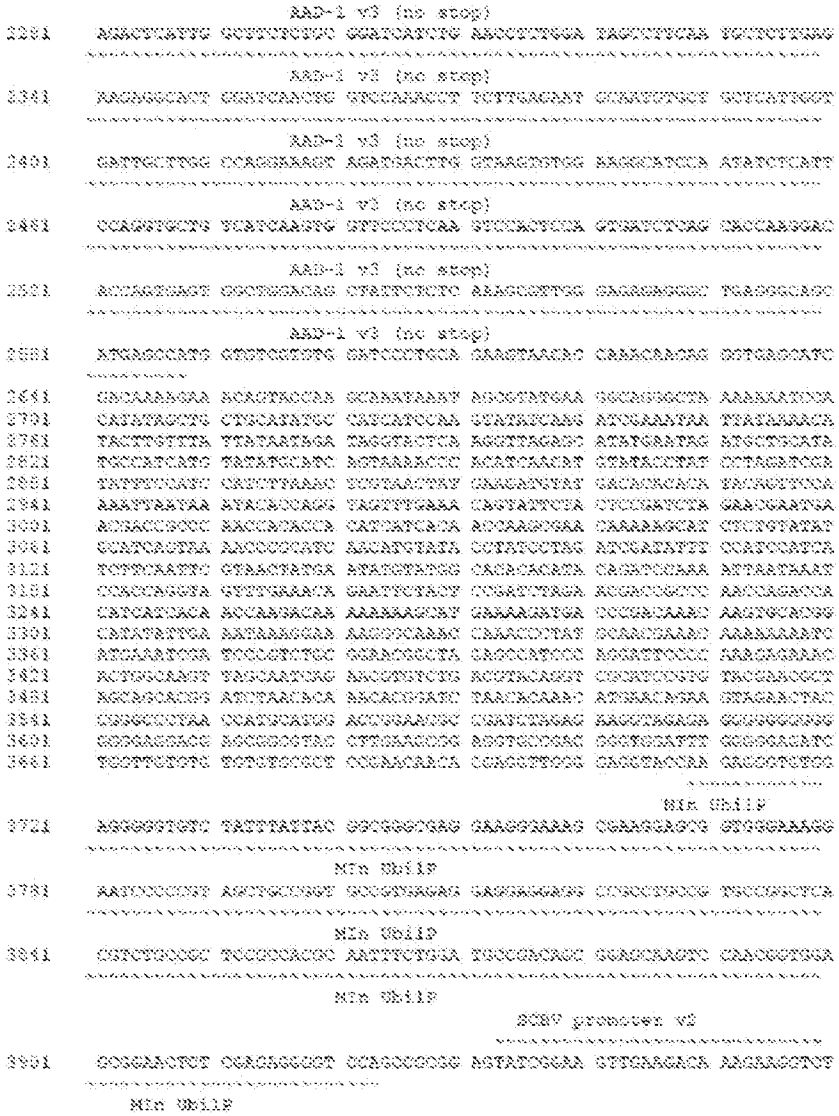
شكل ٣٠



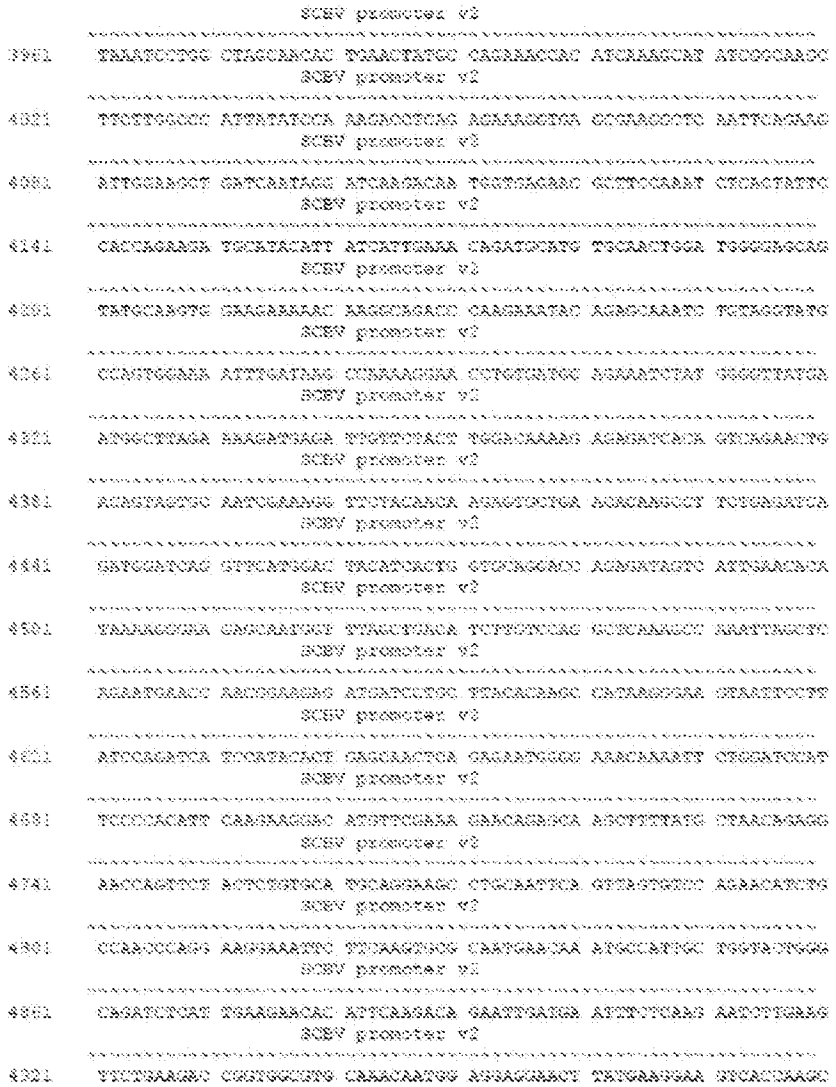
شكل ٢٧أ



شكل ٢٧ب


AAD-1 v3 (no stop)
AAD-1 v3 (no stop)
AAD-1 v3 (no stop)
AAD-1 v3 (no stop)
AAD-1 v3 (no stop)
Nin UbiP
Nin UbiP
Nin UbiP
Nin UbiP
SCBV promoter v2
Nin UbiP

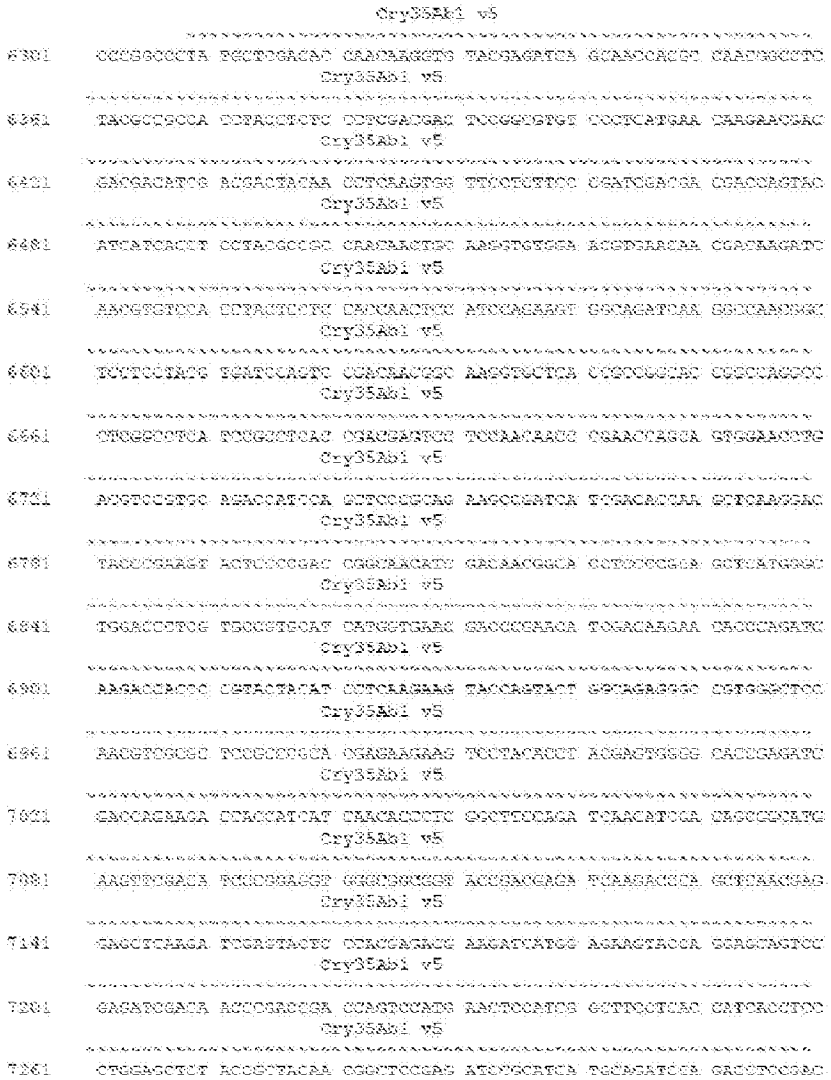
شكل ٢٧ج


SCBV promoter v2
3961 TAAATCCTGG CTAGCAACAC TCAACTATGC CAGAAACCAC ATCAAAGCAT ATCGGCAACC
SCBV promoter v2
4021 TTCGTGGCCC ATTATATCCA AAGACCTCAG AGAAAGCTGA CCGAACCCTC AATTCAGAAG
SCBV promoter v2
4081 ATTGCAACCT CATCAATACC ATCAACACAA TCGTCACAAC GCTTCCAAAT CTCACTATTC
SCBV promoter v2
4141 CACCAGAACA TGCATACATT ATCATTGAAA CAGATCACTG TGCAACTGGA TGGCCAGCAG
SCBV promoter v2
4201 TATGCAAGTG GAAGAAAAAC AAGCCAGACC CAAGAAATAC AGAGCAAAAC TCTAGCTATG
SCBV promoter v2
4261 CCAATGGAAA ATTTGATAAG CCAAAAGAAA CCTGTCAATC AGAAATCTAT GGGCTTATGA
SCBV promoter v2
4321 ATGCCTTAGA AAAGATGACA TTGTTCTACT TGCAACAAAG AGAGATCACA GTCAGAACTG
SCBV promoter v2
4381 ACAGTAGTGC AATCGAAAGG TTCTACAACA AGAGTCCTGA ACACAAGCCT TCTGAATATA
SCBV promoter v2
4441 GATCGATCAG GTTCATTGAC TACATCACTG GTCCAGCAAC AGAATAGTTC ATTGAACAGA
SCBV promoter v2
4501 TAAAACGTAA CAACAATCCC TTACCTTACA TCTTCTTCAG GCTCAAAGCT AAATTAGCTC
SCBV promoter v2
4561 AGAATGAACC AACCGAAGAG ATCATCCTGC TTACACGAGC CATAAGTGAA GTAACTCCTT
SCBV promoter v2
4621 ATTCAGATCA TCCTTACACT CAGCAACTCA GAGAATCGCG AAACAAAATT CTCGATCCAT
SCBV promoter v2
4681 TCCCCACATT CAAGTAAGAC ATCTTCGAAA GAACAGATCA ATCTTTTATC CTAACAGAGG
SCBV promoter v2
4741 AACCAGTTCT ATTCCGTGCA TGCAGGAAGC CTGCAATTCA GTTATGTCCC AGAACATCTG
SCBV promoter v2
4801 CCAACCCAGA AAGAAAATTC TTCAAGGTCG CAATGAACAA ATGCCATTGC TGGTATCGAA
SCBV promoter v2
4861 CAGATCTCAC TGAAGAACAC ATTCAAGACA GAATTGATGA ATTCTTCAAG AATCTTGAAG
SCBV promoter v2
4921 TTCTGAAGAC CGGTGCCTTG CAAACAATGG AGGAGCAACT TATGAATGAA GTCACCAAGC

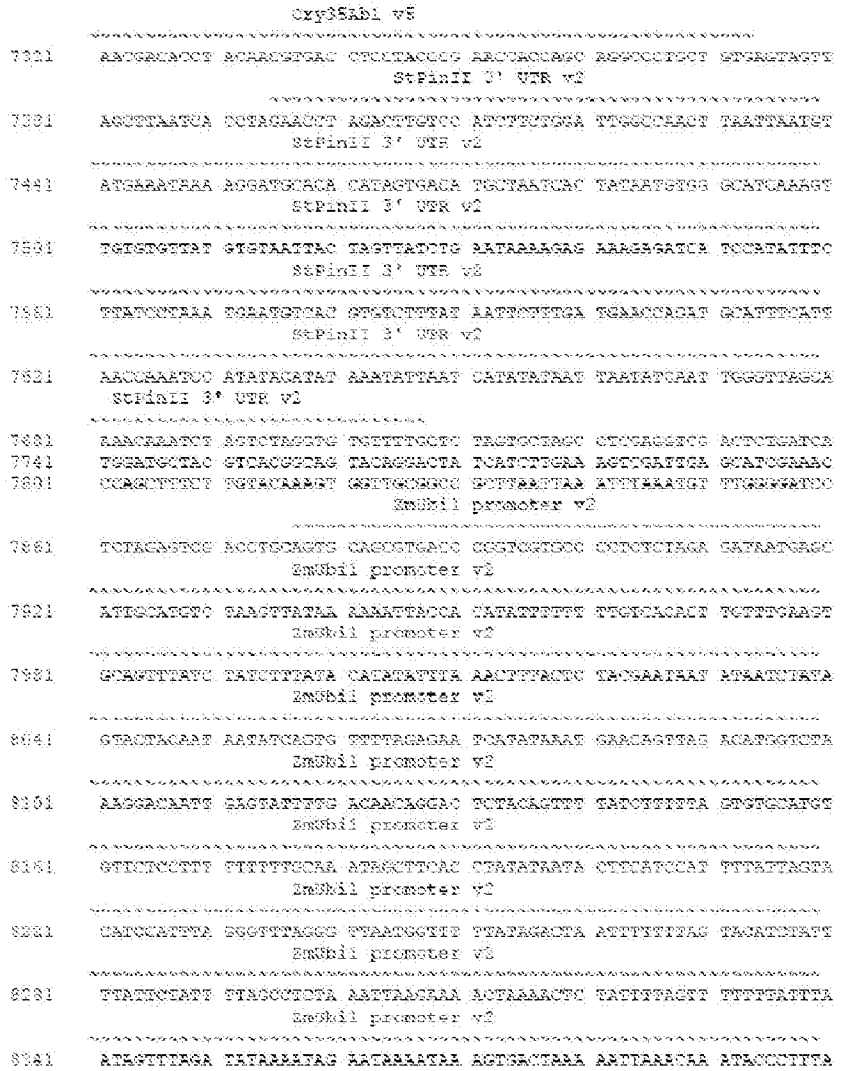
شكل ٢٧د

SCEV promoter v2
4981 TCAACATACA ACACCAGCAC TTCCAAGCAT ACCAAGCCAC ACCAACGCCT ATCTCGCCAG
SCEV promoter v2
5041 TAGCCGCAGA AGATGTGCTA GATCTCCAAG ACGTAAGCAA TGADGATTCA GCAGGCATTG
SCEV promoter v2
5101 ACGTCAGTGA TCACCGCAGC GGAGAGTATT GGGCCCATTC AGTGGATGCT CCACTGAGTT
SCEV promoter v2
5161 GTATTATTGT GTGCTTTTCG CACAAGTGTG CTGTCCACTT TCTTTTGCCA CCTGTGCCAC
SCEV promoter v2
5221 TTTATTCCTT GTCTGCCACC ATCCCTTTGC TCAGCTGCTA ACCAACCATC GCAGTCCGTG
SCEV promoter v2
5281 TGTGATACCA CCCCCCTTCC GATGCTCTGC CTATATAAGG CACCGTCTGT AAGCTCTTAC
SCEV promoter v2
5341 GATCATCGGT AGTTCACCAA GCGCCGGGGT CGGATCTAGC TGAAGGCTCG ACAAGCCAGT
5401 CCACGGAGGA GCTGATATTT GGTGGACAAG CTGTGGATAC GAGCAACCCT ATCCCTAATA
5461 TACCAGCACC ACCAAGTCAG CGCAATCCCC AGATCACCCC AGCAGATTCG AAGAAGGTAC
5521 AGTACACAGA CATCTATATA TGTATGATGT ATCCCTTCGA TCGAAGCCAT GCCTTGGTAT
5581 AATCACTGAG TAGTCATTTT ATTACTTTGT TTTGACAAGT CAGTAGTTCA TCCATTTGTC
5641 CCATTTTTTC AGCCTGCAAC TTTCGTTCCA CTGCCCTTCC TCTAATAACT CACTAGTCAT
5701 TTTATTACCT TGTTTCGCAC ATTCAGTAGC TCATCCATCT GTCCCATTTT TTCAGCTAGG
5761 AAGTTTGGTT GCACTGGCCT TGTACTAATA ACTGATTAGT CATTTTACTA CATTGTTTCG
5821 ACAAGTCAGT AGCTTATCCA TCTTTCCCAT TTTTCAGCTA GGAAGTTCGC GGCTGCACAC
SV6 (no stop)
5881 CACACCATGT CCGCCCGCCA GGTGCACATC GACGTCAACA ACAAGACCGG CCACACCCTC
SV6 (no stop)
5941 CAGCGTGAGC ACAAGACCAA GCTTGAGCTC GGCAGGTTGC TCACTTCCCT CACTAACGTG
SV6 (no stop)
6001 GCCAACGATC AGATCAAGAC CTTCGTTGCC GAATCCAACG GCTTCATGAC CGGCACCGAG
SV6 (no stop)
6061 GGCAGCATGT ACTACTCCAT CAACGGCGAC GCCGAGATCA GCCTCTACTT CGACAACCCG
SV6 (no stop)
6121 TTCCTCGCTT CCAACAAATA CTACGTCCAC TCCAACAACT CCTACATCGA CATCATCACC
SV6 (no stop)
6181 CAGGGCGGCT CCGGCAACCA GTCCCACGTG ACCTACATCA TCCAGACCAC CTCCTCCGCC
SV6 (no stop)
6241 TACGGCCACA AGTCCGAGGG CATAGGAAGT CTTCTAACAT GCGGTGACGT GGAGGAGAAT

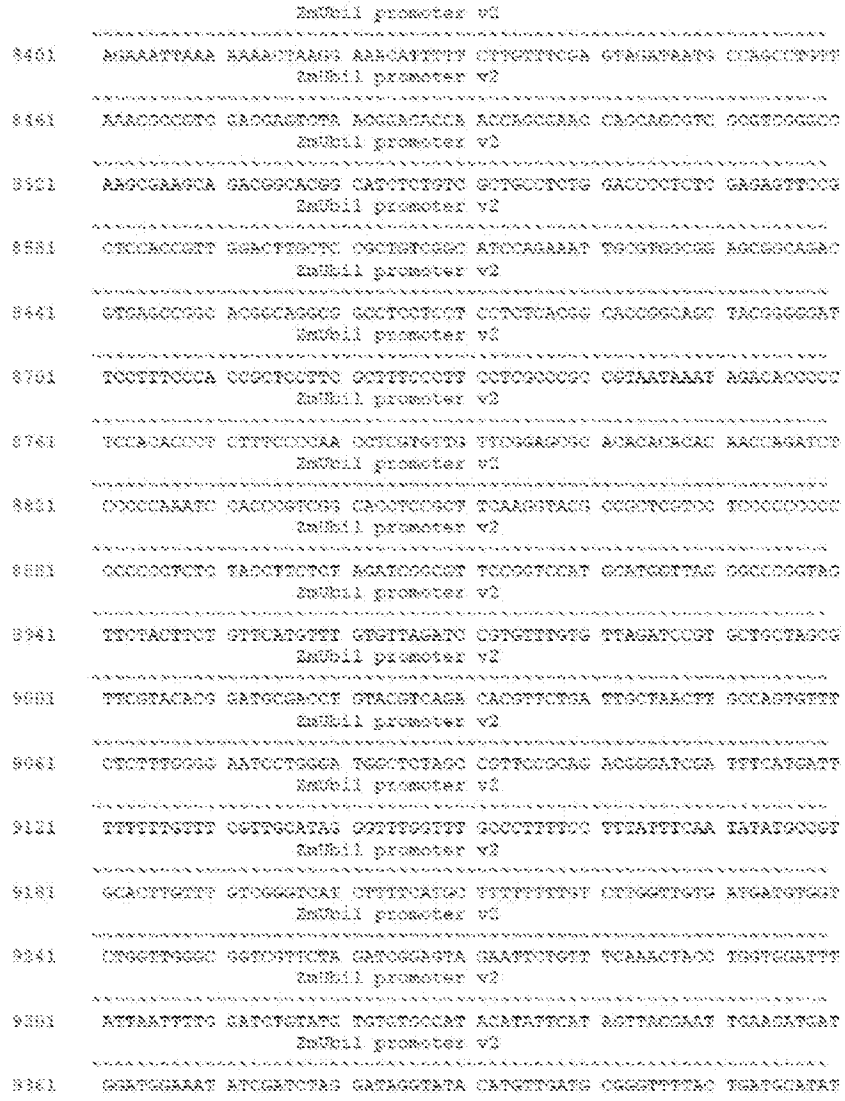
شكل ٢٧هـ


Cry35Ab1 v5
6301 CCCGGCCCTA TCCTCGACAC CAACAAGGTG TACGAGATCA GCAACGACGC CAACGGCGTC
Cry35Ab1 v5
6361 TACGCCGCCA CCTACCTCTC CTTCGACGAC TCCGGCGTGT CCCTCATGAA CAAGAACGAC
Cry35Ab1 v5
6421 GACGACATCG ACGACTACAA CTTCAAGTGG TTCCTCTTCC CGATCGACGA CGACCAGTAC
Cry35Ab1 v5
6481 ATCATCACCT CCTACGCCGC CAACAACTAC AAGGTGTGGA ACGTGAACAA CGACAAGATC
Cry35Ab1 v5
6541 AACGTGTCCA CCTACTTCTC CAACAACTCC ATCCAGAAGT GGCAGATCAA GGCCAAGAAC
Cry35Ab1 v5
6601 TCCTCCATCG TGATCCACTC CGACGACTGC AAGGTGCTCA CCGCCGCCAC CGCCAAGCCC
Cry35Ab1 v5
6661 CTGGCCTCCA TCGCCTCCAC CGACGACTCC TCCAACAACC CGAACTACGA GTGGAACCTG
Cry35Ab1 v5
6721 ACGTCCGTCC AGACCATCCA GTCCCGCCAG AAGCCGATCA TCGACAACCAA GCTCGAGGAC
Cry35Ab1 v5
6781 TACCCGAAGT ACTCCCCGAC CGGCAAGATC GACAACGGCA GCTCCCCGGA GCTCATGAAC
Cry35Ab1 v5
6841 TGGACCCTCG TCGCGTCCAT CATGGTGAAC GAGCCGAACA TCGACAAGAA CAGCCAGATC
Cry35Ab1 v5
6901 AAGACCAACC CGTACTACTAT CTTCAAGAAG TACCAGTACT GGCAGAAGGC CGTGGAGTCC
Cry35Ab1 v5
6961 AACGTGCGCC TCGCCGTCGA CGAGAAGAAG TCCTACACCT ACGACTGGCG CACCGAGATC
Cry35Ab1 v5
7021 CAGCAGAACA CTACCATCAT CAACACCCTC GACTTCCAGA TCAACATCGA CAGCCGCATG
Cry35Ab1 v5
7081 AAGTTCGACA TCCCCGAGGT GGGCGGCCGT ACCGACGACA TCAAGACCCA GCTCAACGAG
Cry35Ab1 v5
7141 TACCTCAAGA TCGTGTACTC CTACGACAAC AAGATCATGG AGAAGTACGA GGACTACTCC
Cry35Ab1 v5
7201 GACATCGACA ACCCGCCCGA CCACTCCAAG AACTCCATCG GCTTCCTCAC CATCGACTCC
Cry35Ab1 v5
7261 CTGGAGCTCT ACCGCTACAA CGGCTCCGAG ATCTGCATCA TGCAGATCGA GACCTCCGAC

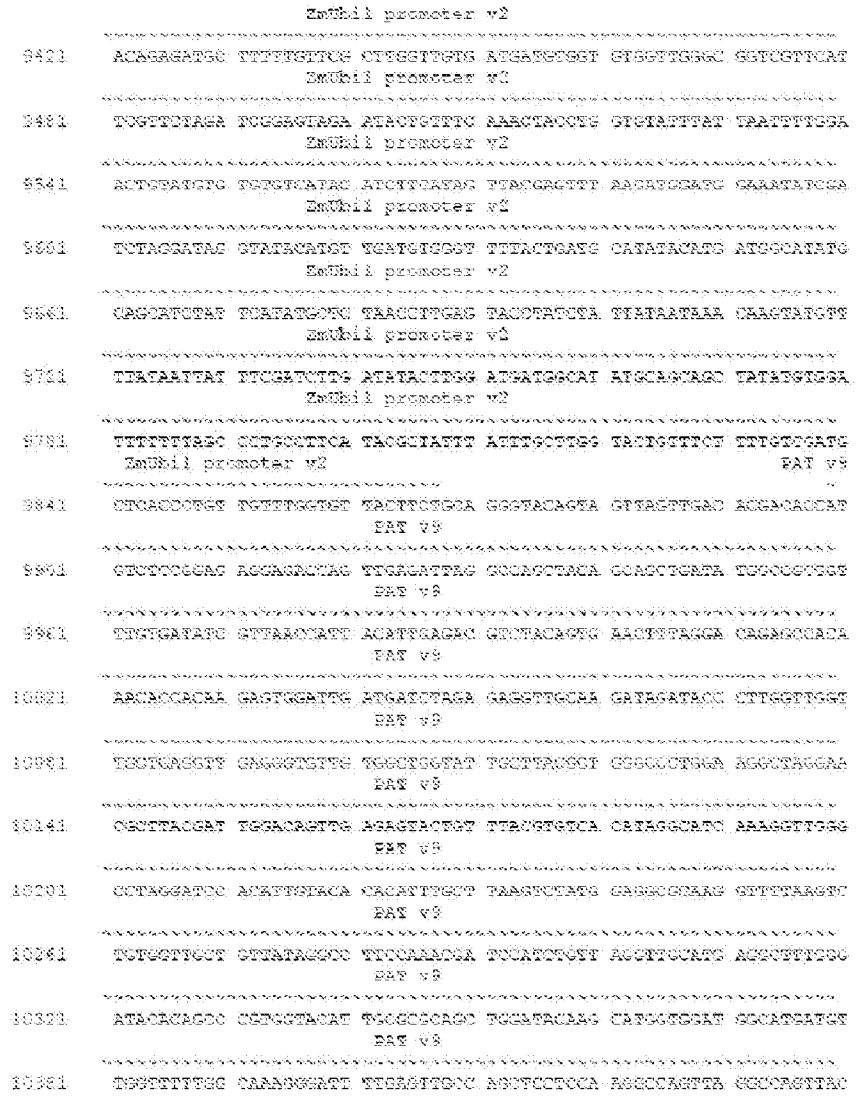
شكل ٢٧و


Cry35Ab1 v5
StPinII 3' UTR v2
StPinII 3' UTR v2
StPinII 3' UTR v2
StPinII 3' UTR v2
StPinII 3' UTR v2
StPinII 3' UTR v2
ZmUbi1 promoter v2
ZmUbi1 promoter v2
ZmUbi1 promoter v2
ZmUbi1 promoter v2
ZmUbi1 promoter v2
ZmUbi1 promoter v2
ZmUbi1 promoter v2
ZmUbi1 promoter v2

شكل ٢٧ز


ZmUbi1 promoter v2
8401 AGAAATTAAA AAAACTAAUG AAACATTTTT CTTGTTTCGA GTAAAATAAA CCTAGCCTGTT
ZmUbi1 promoter v2
8461 AAACCCCCTC GACGGATCTA AGGCACACCA ACCAGCGAAC CACCAACCTC CCCTCCGCCC
ZmUbi1 promoter v2
8521 AAGCGAAGCA GACGGCACGG CATTTCTGTC GTTGCCTCTG GACCCCTCTC GAGAGTTCCG
ZmUbi1 promoter v2
8581 CTCCACCGTT GGACTTGCTC CGCTGTCGGC ATCCAGAAAT TGCGTGGCGG AGCGGCAGAC
ZmUbi1 promoter v2
8641 GTGAGCGCGC ACGGCAGGCG GCCTCCTCCT CCTCTCACGG CACCGGCAGC TACGGGGGAT
ZmUbi1 promoter v2
8701 TCCTTTCCCA CCGCTCCTTC GCTTTCCCTT CCTCGCCCGC CGTAATAAAT AGACACCCCT
ZmUbi1 promoter v2
8761 TCCACACCTT CTTTCCCCAA CCTCGTGTTG TTCGGAGCGC ACACACACAC AACCAGATCT
ZmUbi1 promoter v2
8821 CCCCCAAATC CACCCGTCGG CACCTCCGCT TCAAGGTACG CCGCTCGTCC TCCCCCCCCC
ZmUbi1 promoter v2
8881 CCCCGCTCTC TAGCTTCTCT AGATCGGCGT TCCGGTCCAT GCATCGTTAC CGCCGGTAG
ZmUbi1 promoter v2
8941 TTCTACTTCT GTTCATGTTT GTGTTAGATC CGTGTTTGTG TTAGATCCGT GCTGCTAGCG
ZmUbi1 promoter v2
9001 TTCGTACACG GATGCGACCT GTACGTCAGA CACGTTCTGA TTGCTAACTT GCCAGTGTTT
ZmUbi1 promoter v2
9061 CGCTTTGGGG AATCCTGGGA TGGCTCTAGC CGTTCCGCAG ACGGGATCGA TTTCATGATT
ZmUbi1 promoter v2
9121 TTTTTTGTTT CGTTGCATAG GGTTTGGTTT GCCCTTTTTC TTTATTTCAA TATATGCCGT
ZmUbi1 promoter v2
9181 GCATCTTGTT GTCGGGTCAA CTTTTCATAC TTTTTTTTGT CTTGGTTGTG ATGATGTGAT
ZmUbi1 promoter v2
9241 CTTGCTTGGC GGTCGTTCTA GATCGGAGTA GAATTCTGTT TCAAACTACC TGGTGGATTT
ZmUbi1 promoter v2
9301 ATTAATTTTG CATCTGTATC TGTCTCCCAT ACATATTCAT AGTTACGAAT TGAAGATGAT
ZmUbi1 promoter v2
9361 GGATGAAAAT ATCGATCTAG GATAGGTATA CATGTTGATG CGGGTTTTAC TGATGCATAT

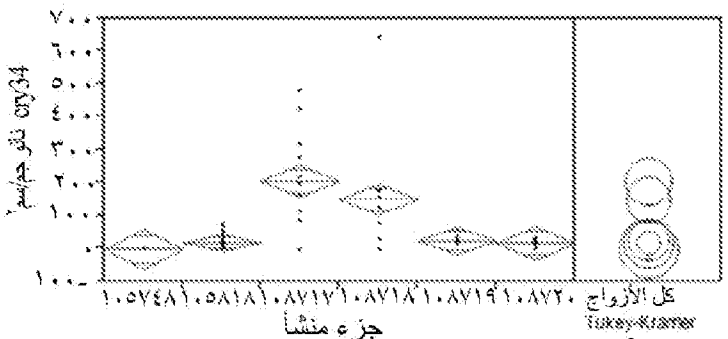
شكل ٢٧ح


ZmUbi1 promoter v2
9421 ACAGAGATGC TTTTTGTTCG CTTGGTTGTG ATGATGTGGT GTGGTTGGGC GGTCGTTCAT
ZmUbi1 promoter v2
9481 TCGTTCTAGA TCGGAGTAGA ATACTGTTTC AAACTACCTG GTGTATTTAT TAATTTTGGA
ZmUbi1 promoter v2
9541 ACTGGATGTG TGTGTCATAC ATCTTCATAG TTACGAGTTT AAGATGGATG GAAATATCGA
ZmUbi1 promoter v2
9601 TCTAGGATAG GTATACATGT TGATGTGGGT TTTACTGATG CATATACATG ATGGCATATG
ZmUbi1 promoter v2
9661 CAGCATCTAT TCATATGCTC TAACCTTGAG TACCTATCTA TTATAATAAA CAAGTATGTT
ZmUbi1 promoter v2
9721 TTATAATTAT TTCGATCTTG ATATACTTGG ATGATGGCAT ATGCAGCAGC TATATGTGGA
ZmUbi1 promoter v2
9781 TTTTTTAGC CCTGCCTTCA TACGCTATTT ATTTGCTTGG TACTGTTTCT TTTGTCGATG
ZmUbi1 promoter v2 PAT v9
9841 CTCAACCCTGG TGTTTGGTGT TACTTCTGCA GGGTACAGTA GTTAGTTGAC ACGACACCAT
PAT v9
9901 GTCTTTCGCAG ACGAGCATAG TTGAGATTAG GCCAGCTACA GCAGCTGATA TGCCCGTCGT
PAT v9
9961 TTGTGATATC GTTAACGATT ACATTGAGAC GTCTACAGTG AACTTTAGGA CAGAGCCACA
PAT v9
10021 ACCACCACAA GAGTGGATTG ATGATCTAGA GAGGTTGCAA GATAGATACC CTTGGTTGGT
PAT v9
10081 TGCTGACGTT GAGGGTGTTG TGGCTGGTAT TGCTTATGCT GCGCTCTGGA AGGCTAGGAA
PAT v9
10141 CGCTTACGAT TGGACGATTG AGAGTACTGT TTACGTGTCA CATAGGCATC AAAGGTTGGG
PAT v9
10201 CCTAGGATCC ACATTGTACA CACATTGCCT TAAGTCTATG GAGGCGCAAG GTTTTAAGTC
PAT v9
10261 TCTGGTTGCT GTTATACGCC TTTCAAACGA TCCATTCGGT ACGTTGCATC ACGCTTTCGC
PAT v9
10321 ATACGCAGCC CCTGGTACAT TGCGCCCAGC TGCATACAAG CATGGTGCAT GGCATGATGT
PAT v9
10381 TGGTTTTTGC CAAAAGGATT TTGAGTTGTC AGTTCCTCCA AGCCCAGTTA GCCCAGTTAC

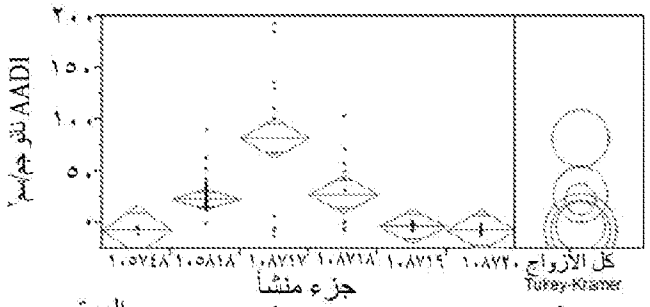
شكل ٢٧ط

```
      PAT v9                                                    ZmLip 3' UTR v1
      ~~~~~~~~~~                                                ~~~~~~~~~~~~~~
10441 CCAGATCTGA CTGAGCTTGA GCTGATGAGC TTATGAGCTT AGAGCTCGGT CGCAGCGTGT
                        ZmLip 3' UTR v1
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
10501 GCGTGTCCGT CGTACGTTCT GGCCGGCCGG GCGTTGGGCG CGCGATCAGA ACCGTTGCGT
                        ZmLip 3' UTR v1
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
10561 TGGCGTGTGT GTGCTTCTGG TTTGCTTTAA TTTTATCAAG TTTGTTTCAA GGTGGATCGC
                        ZmLip 3' UTR v1
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
10621 GTGGTCAAGG CCCGTGTGCT TTAAAGACGC ACGGCACCGG GCACGTAGTG TTGCTGCTTG
                        ZmLip 3' UTR v1
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
10681 TGTAGGCTTT GGTACGTATG GGCTTTATTT GCTTCTGGAT GTTGTGTACT ACTTGGGTTT
                        ZmLip 3' UTR v1
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
10741 GTTGAATTAT TATGAGCAGT TGCGTATTGT AATTCAGCGG GGCTACCTGG ATATTGTTAT
              ZmLip 3' UTR v1
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
10801 GTATTAATAA ATGCTTTGCT TTCTTCTAAA GATCTTTAAG TGCTTCTAGA GCATGCACAT
10861 AGACACAGAC ATCATCTCAT TGATGCTTGG TAATAACTGT CATTAGATTC TTTTTATGCA
10921 TAGATGCACT CGAAATCAGC CAATTTTAGA CAAGTATCAA ACGGAGGTGA CTTCAGTACA
10981 TTAAAAACGT CCTGCAATGTG TTATTAAGTT GTCTAAGCGT CAATTTGATT TACAATTGAA
11041 TATATGCTGC CCTAGCCAGC CAACAGCTCC ATTTACAATT CAATATATCC TGCCGCCTGG
11101 CCCACGGCTG TCGACGAATT CTCATCTGCC CCCGATTTCG ACCTGAATGT AGTACACGTC
11161 AAATAAAGAT TTCCGAATTA GAATAATTTG TTTATTGCTT TCGCCTATAA ATACGACGGA
11221 TCGTAATTTG TCGTTTTATC AAAATGTACT TTCATTTTAT AATAACGCTG CGGACATCTA
11281 CATTTTTGAA TTGAAAAAAA ATTGCTAATT ACTCTTTCTT TTTCTCCATA TTGACTATCA
11341 TACTCACTGC TGATCCATGT AGATTTCCCG GACATGAAGC CATTTACAAT TGAATATATC
11401 CTGCCG
```

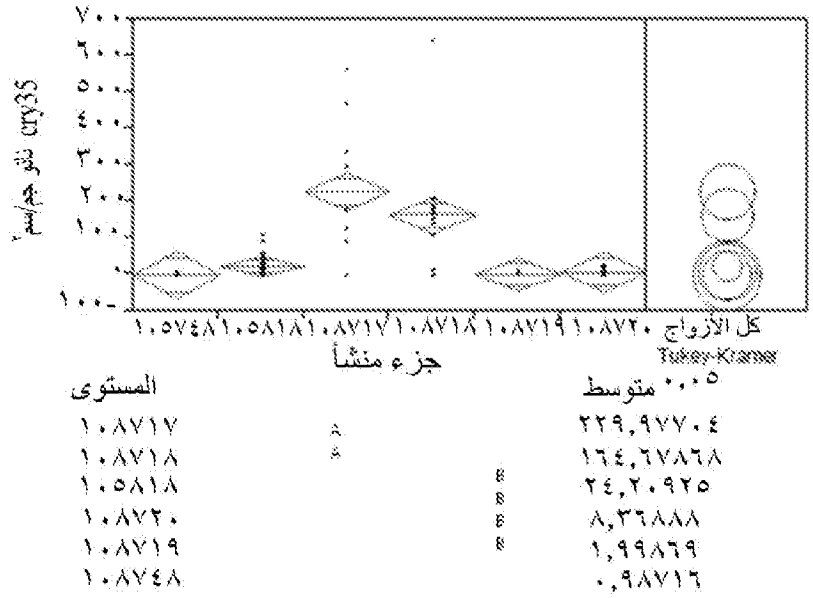
شكل ٢٧ي



شكل ٢٨أ



شكل ٢٨ب


٧٠٠
٦٠٠
٥٠٠
٤٠٠
٣٠٠
٢٠٠
١٠٠
١٠٠-
cry35 نقو جم/سم٢
كل الأزواج
١٠٨٧٢٠
١٠٨٧١٩
١٠٨٧١٨
١٠٨٧١٧
١٠٥٨١٨
١٠٥٧٤٨
جزء منشأ
Tukey-Kramer
٠,٠٥ متوسط
٢٢٩,٩٧٧٠٤
١٦٤,٦٧٨٦٨
٢٤,٢٠٩٢٥
٨,٣٦٨٨٨
١,٩٩٨٦٩
٠,٩٨٧١٦
المستوى
١٠٨٧١٧
١٠٨٧١٨
١٠٥٨١٨
١٠٨٧٢٠
١٠٨٧١٩
١٠٨٧٤٨

شكل ٢٨ج

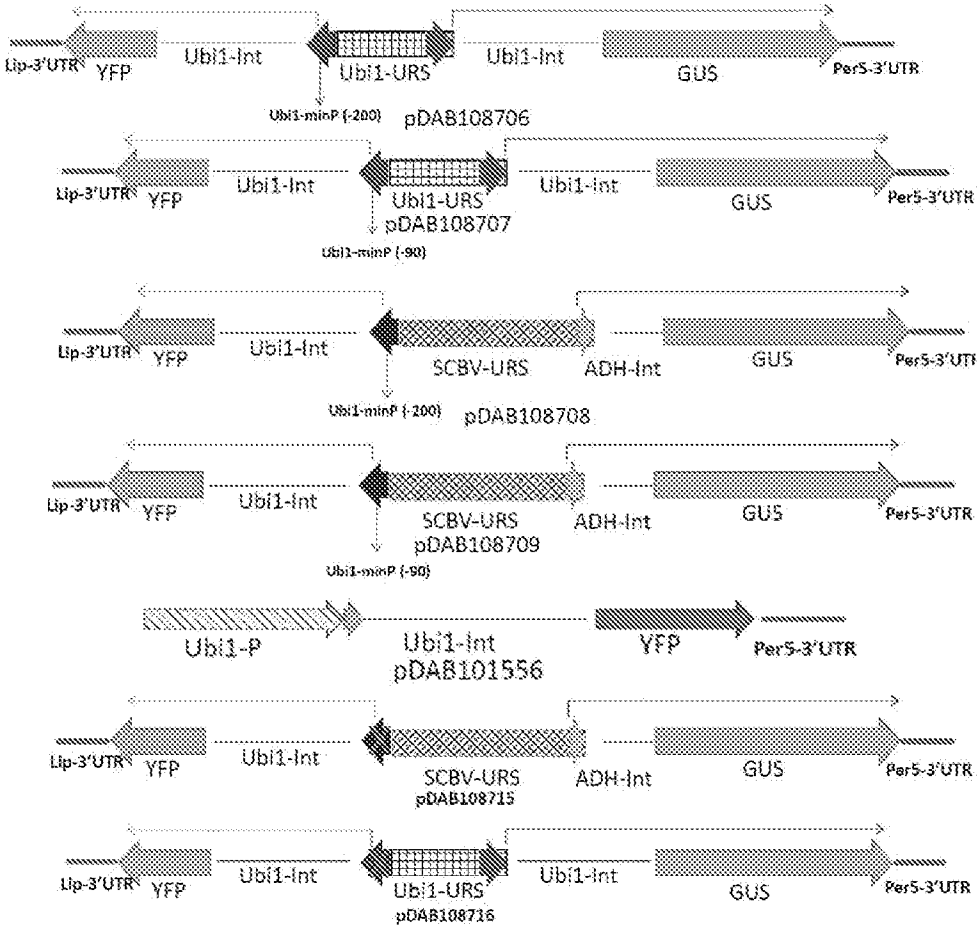
هوية متوالية رقم : ٥١

MSSGALLFHG KIPYVVEMEG NVDGHTFSIR GKGYGDASVG KVDAQFICTT GDVPVPWSTL
VTTLTYGAQC FAKYGPELKD FYKSCMPEGY VQERTITFEG DGVFKTRAEV TFENGSVYNR
VKLNGQGFKK DGHVLGKNLE FNFTPHCLYI WGDQANHGLK SAFKIMHEIT GSKEDFIVAD
HTQMNTPIGG GPVHVPEYHH ITYHVTLSKD VTDHRDNMSL VETVRAVDCR KTYL

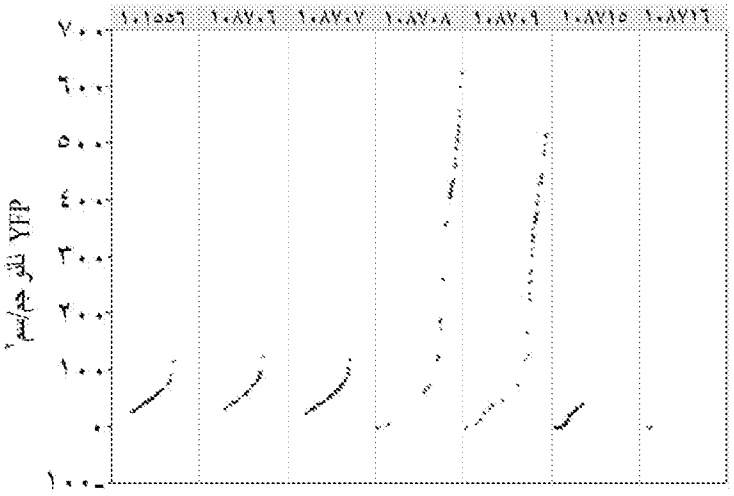
هوية متوالية رقم : ٥٢

MSSGALLFHG KIPYVVEMEG NVDGHTFSIR GKGYGDASVG KVDAQFICTT GDVPVPWSTL
VTTLTYGAQC FAKYGPELKD FYKSCMPDGY VQERTITFEG DGNFKTRAEV TFENGSVYNR
VKLNGQGFKK DGHVLGKNLE FNFTPHCLYI WGDQANHGLK SAFKICHEIT GSKGDFIVAD
HTQMNTPIGG GPVHVPEYHH MSYHVKLSKD VTDHRDNMSL KETVRAVDCR KTYL

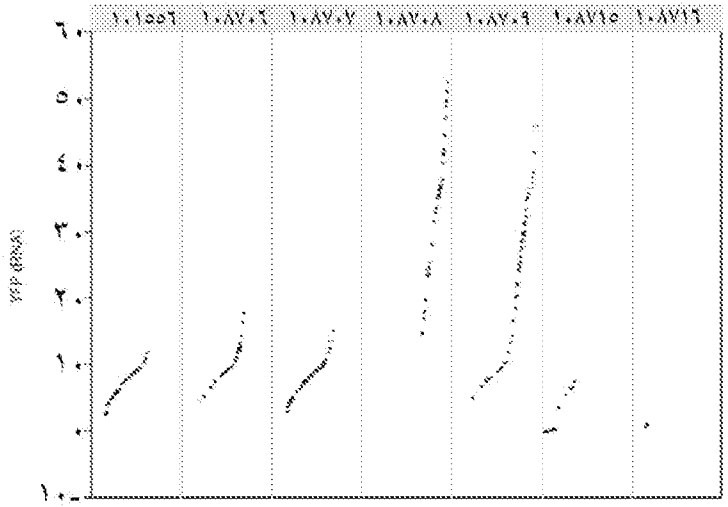
شكل ٢٩


Lip-3'UTR
YFP
Ubi1-Int
Ubi1-URS
Ubi1-Int
GUS
Per5-3'UTR
Ubi1-minP (-200)
pDAB108706
Ubi1-URS
pDAB108707
Ubi1-minP (-90)
SCBV-URS
ADH-Int
pDAB108708
pDAB108709
Ubi1-P
pDAB101556
pDAB108715
pDAB108716

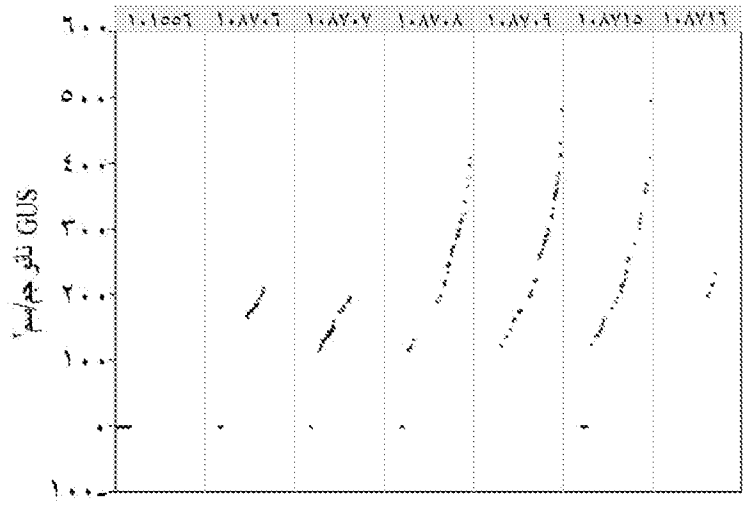
شكل ٣٠



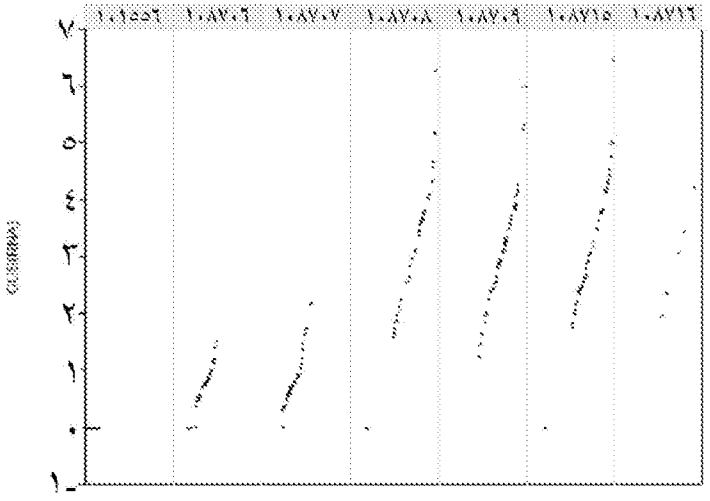
شكل ٣١أ



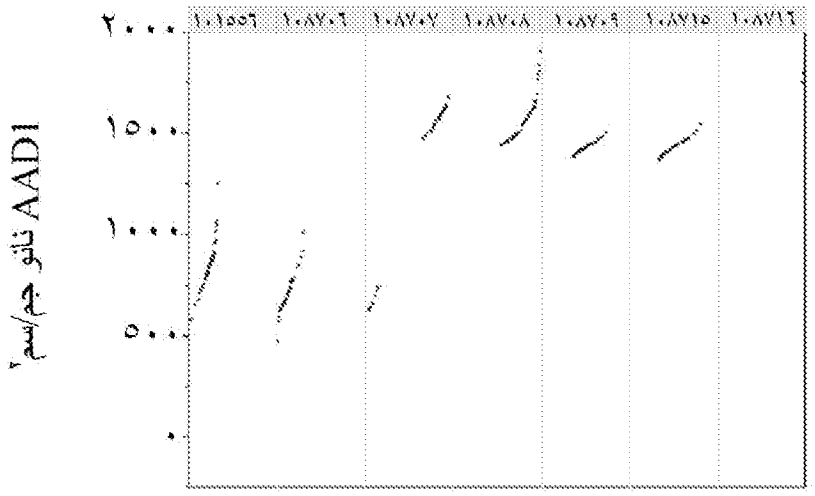
شكل ٣١ب



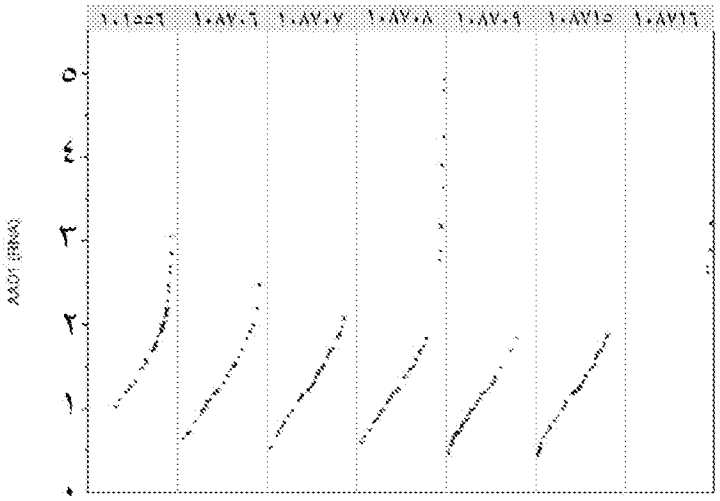
شكل ٣٢أ



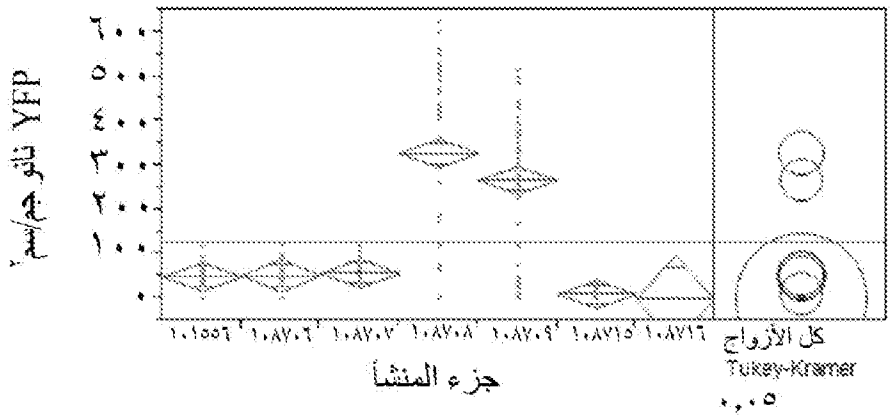
شكل ٣٢ب



شكل ٣٣أ

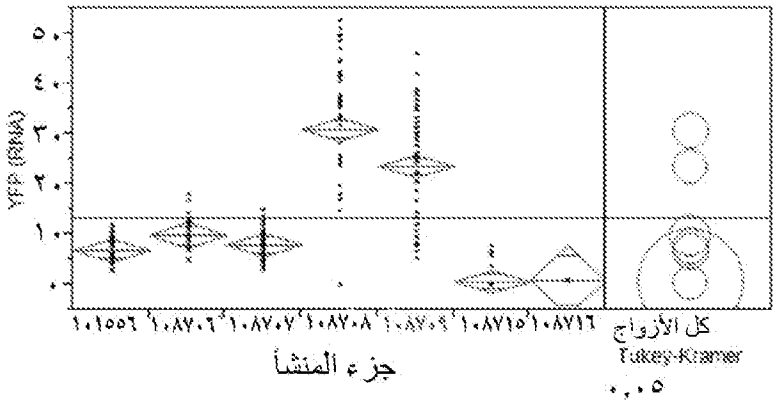


شكل ٣٣ب



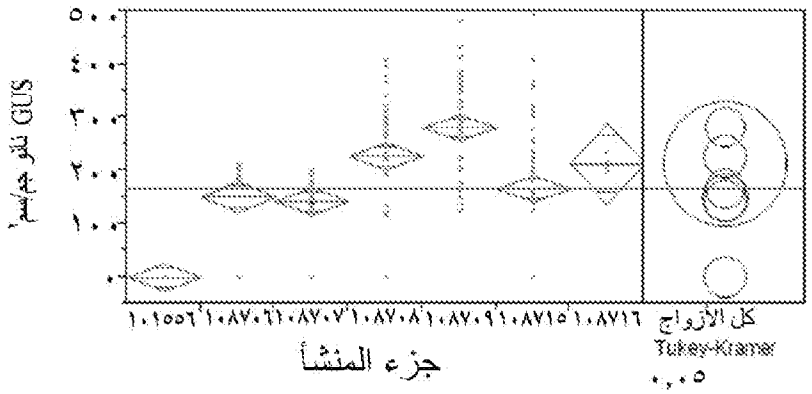
١٠٨٧٠٨		٣٢٨,٣٢٧٦
١٠٨٧٠٩		٢٦٧,٦٨٧٦
١٠٥٨٠٧	B	٧٥,٦٣٣٣٦
١٠٨٧٠٦	B	٥٢,٦٦٥٤
١٠١٥٥٦	B	٤٩,٧٥٩٧٢
١٠٨٧١٥	B	١٠,٦٣٢٠٢
١٠٨٧١٦	B	٠

شكل ٣٤أ



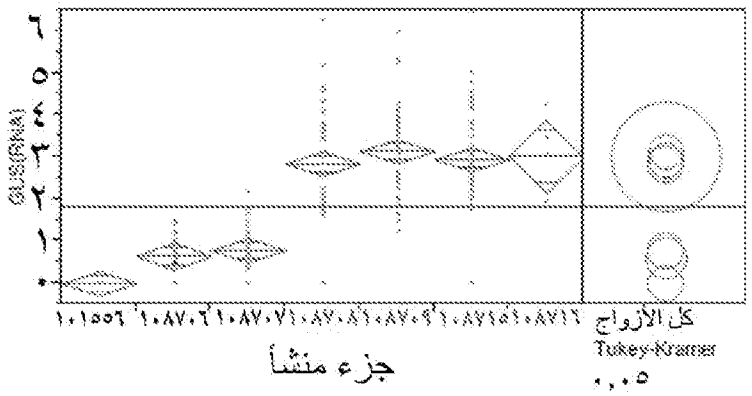
١٠٨٧٠٨	أ			٣١,٠٢٠١٩
١٠٨٧٠٩	أ	B		٢٣,٦٨٠٤٤
١٠٥٨٠٧		C		٩,٩٦٦٠٢٩
١٠٨٧٠٦		C		٨,٠٧٢٨
١٠١٥٥٦		C		٦,٩٥٤٤٢٢
١٠٨٧١٦			D	١,٠١١٥٨
١٠٨٧١٥			D	٠,٧٦٧٨٥٤

شكل ٣٤ب



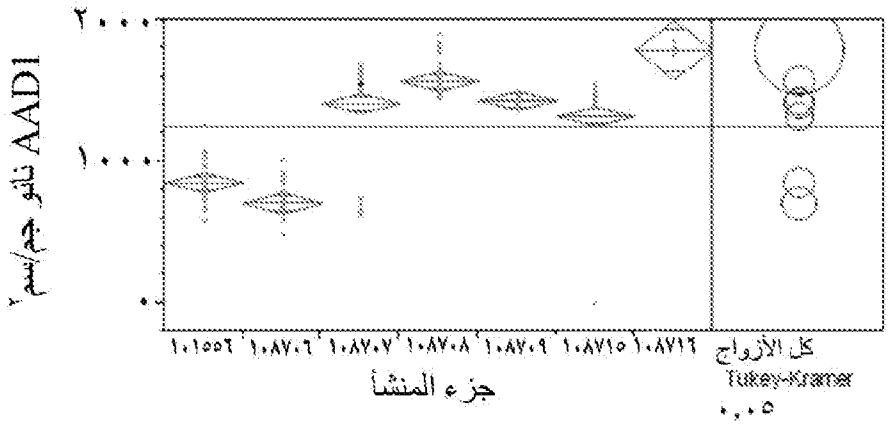
	المستوى	متوسط
١٠٨٧٠٩	A	٢٨٢,٢٢٩٠٩
١٠٨٧٠٨	B	٢٢٨,١٧٢٠٥
١٠٨٧١٦	A B C	٢١٣,٩٧٧٣٩
١٠٨٧١٥	C	١٦٦,٥٢١٠٢
١٠٨٧٠٦	C	١٥١,٢٧٧٧٦
١٠٨٧٠٧	C	١٤٣,٢٢٢٩٧
١٠١٥٥٦	D	٠,٠٠٠٠٠

شكل ٣٥أ



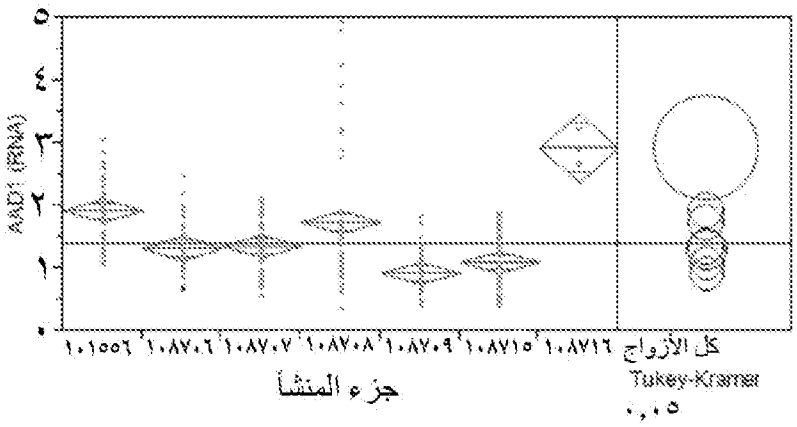
أ١٠٨٧٠٩			٣,١٤١٣٦
أ١٠٨٧١٦			٣,٠٢٦٦
أ١٠٨٧١٥			٢,٩٤٩٤٦٦
أ١٠٨٧٠٨	B		٢,٨٥١٧٢٥
١٠٨٧٠٧	B	C	٠,٧٨٤٢٤٢
١٠٨٧٠٦		C	٠,٦٤٧٢١١
١٠١٥٥٦			٠

شكل ٣٥ب



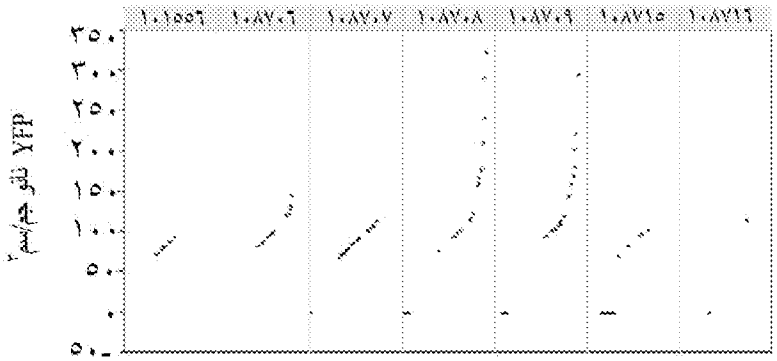
المستوى				متوسط
١٠٨٧١٦	A			١٧٩٥,٤٣٣٢
١٠٨٧٠٨	A	B		١٥٧٤,٨٦٥٤
١٠٥٨٠٩		B	C	١٤٣٧,٢٦٥٨
١٠٨٧٠٧			C	١٤١٧,٠١٠١
١٠٨٧١٥			C	١٣٢٥,٨١٣٥
١٠١٥٥٦			D	٨٥٦,٥٨٠٠
١٠٨٧٠٦			D	٧١٠,٨٨٠٢

شكل ٣٦أ

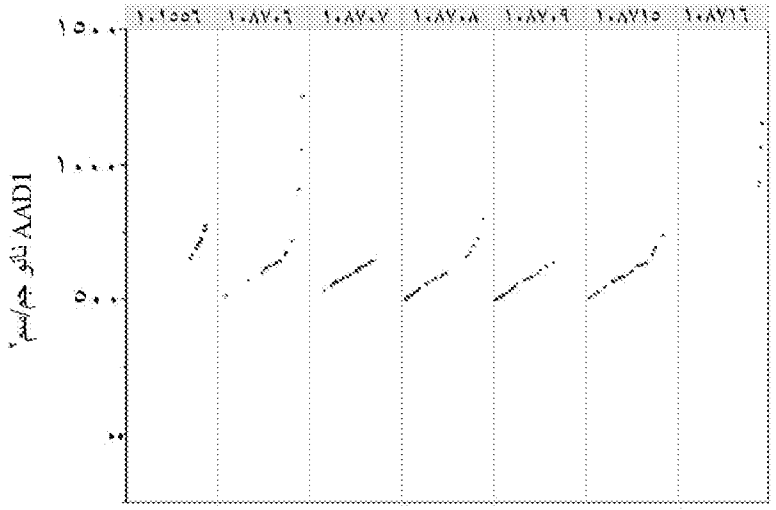


١٠٨٧١٦	أ					٢,٩٣٣٨
١٠١٥٥٦		ب				١,٩٣٦٩٣٣
١٠٨٧٠٨		ب	ج			١,٧٥٢٨٦٩
١٠٥٨٠٧			ج	د		١,٣٦٨٧١٣
١٠٨٧٠٦				د	ه	١,٣٣٣٦٨٦
١٠٨٧١٥					ه	١,١١٠٤٣
١٠٨٧٠٩						٠,٩٣٧١٠٨

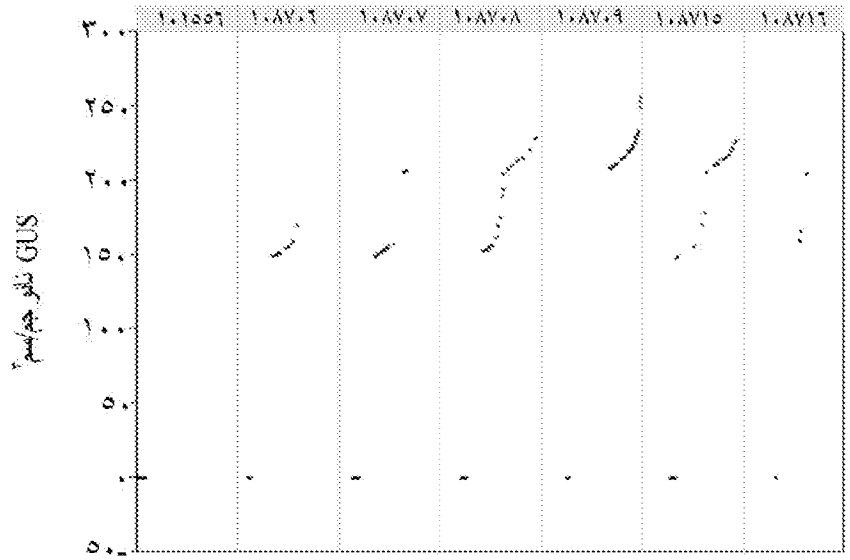
شكل ٣٦ب



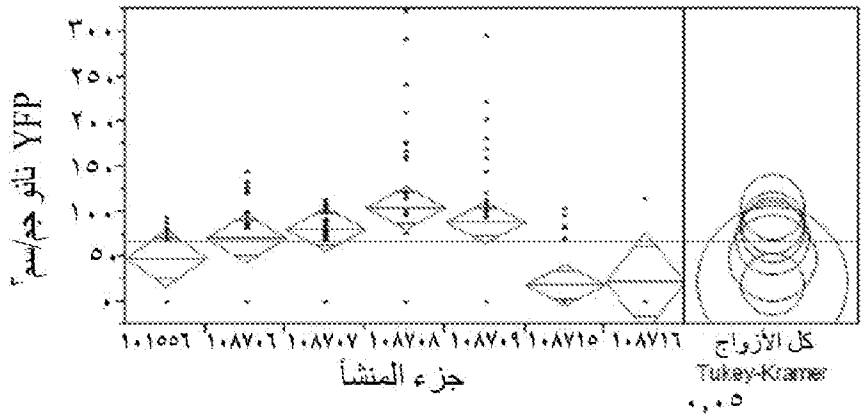
شكل ٣٧أ



شكل ٣٧ب

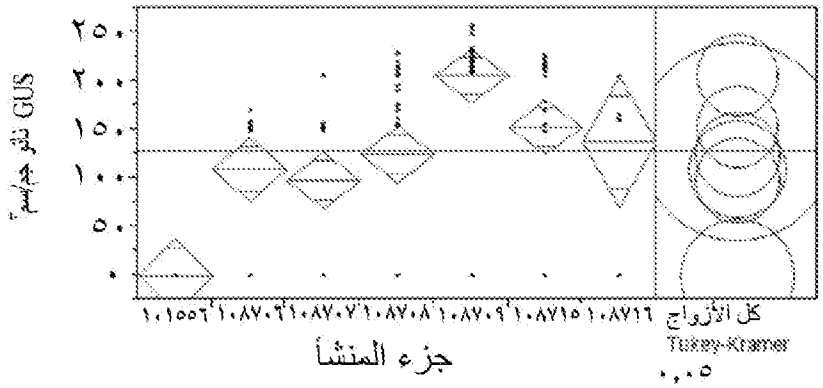

١٠١٥٥٦
١٠٨٧٠٦
١٠٨٧٠٧
١٠٨٧٠٨
١٠٨٧٠٩
١٠٨٧١٥
١٠٨٧١٦
٣٠٠
٢٥٠
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
٠
٥٠-
GUS نانو جم/سم٢

شكل ٣٧ج



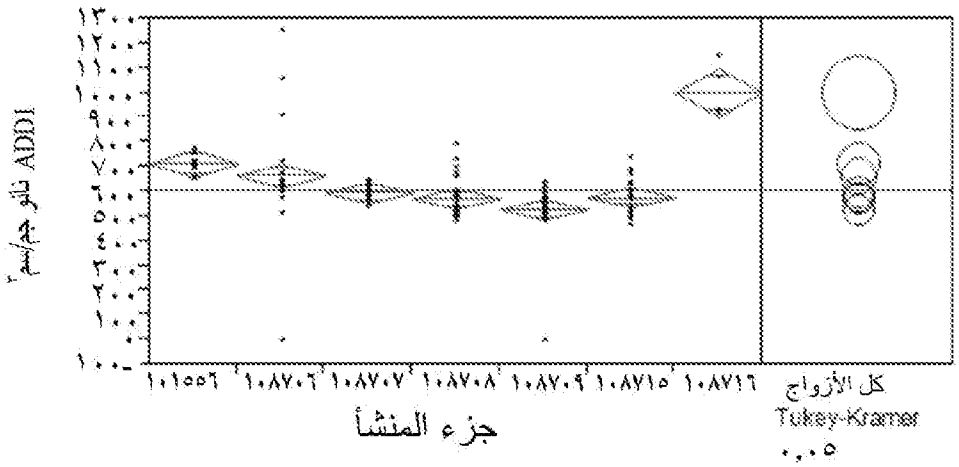
	المستوى	متوسط
١٠٨٧٠٨	A	١٠٥,٥٣٤٥١
١٠٨٧٠٩	A	٨٩,٤٣٣٠٧
١٠٥٨٠٧	A	٨١,٨٠٨٧٢
١٠٨٧٠٦	A B	٧١,٧٦٦٧٨
١٠١٥٥٦	A B	٤٩,٥٨٣٣٢
١٠٨٧١٦	A B	٢٣,٠١٢٠١
١٠٨٧١٥	B	١٩,٩٤٢٩٠

شكل ٣٨أ



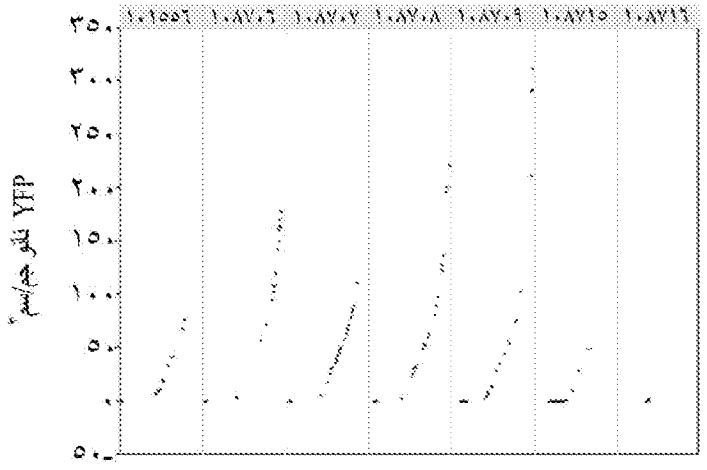
المستوى		متوسط
١٠٨٧٠٩A		٢٠٦,١٣٠٢١
١٠٨٧١٥A	B	١٥٣,٠٦٢٧٣
١٠٨٧١٦A	B	١٣٨,٠٢٠٠٩
١٠٨٧٠٨	B	١٢٥,٠٠٩٣٦
١٠٨٧٠٦	B	١٠٩,٦٣٠٦٥
١٠٨٧٠٧	B	٩٨,٢٤٥٤٩
١٠١٥٥٦	C	٠,٠٠٠٠٠

شكل ٣٨ب

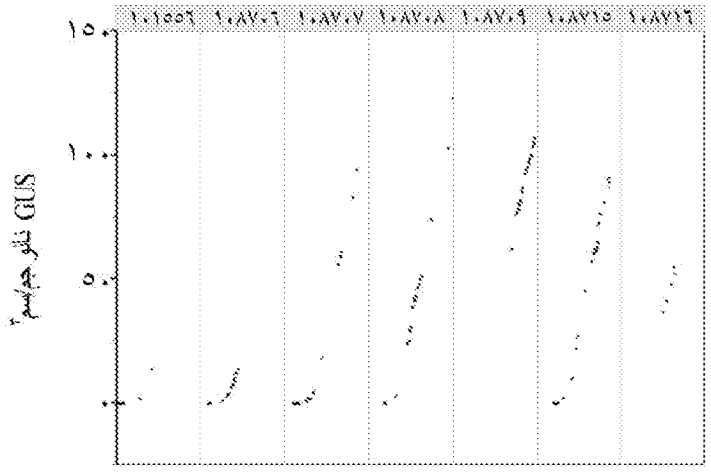


المستوى		متوسط
١٠٨٧١٦	A	١٠٠٢,٨٤٤٨
١٠١٥٥٦	B	٧١٥,١٢٤٨
١٠٨٧٠٦	BC	٦٦٦,١٠٨٨
١٠٨٧٠٧	CD	٥٩٧,٨٠٠٥
١٠٨٧١٥	CD	٥٧٨,٧٢٧٦
١٠٨٧٠٨	CD	٥٧٤,١٠٨٨
١٠٨٧٠٩	D	٥٣٠,٣٣٧٩

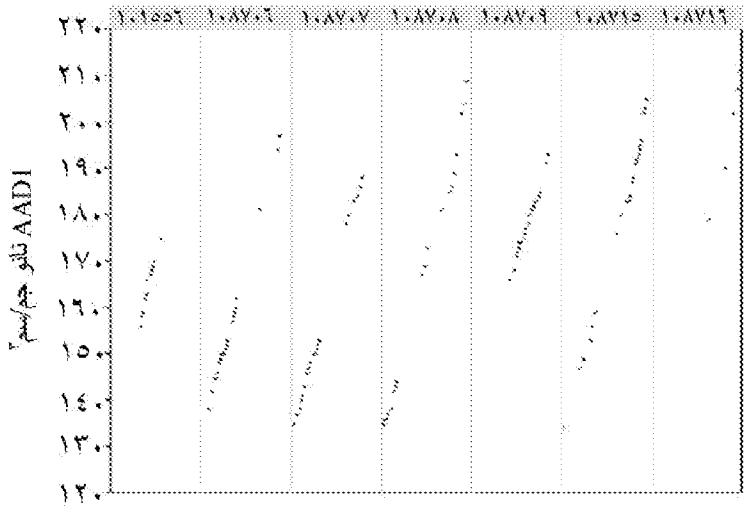
شكل ٣٨ج



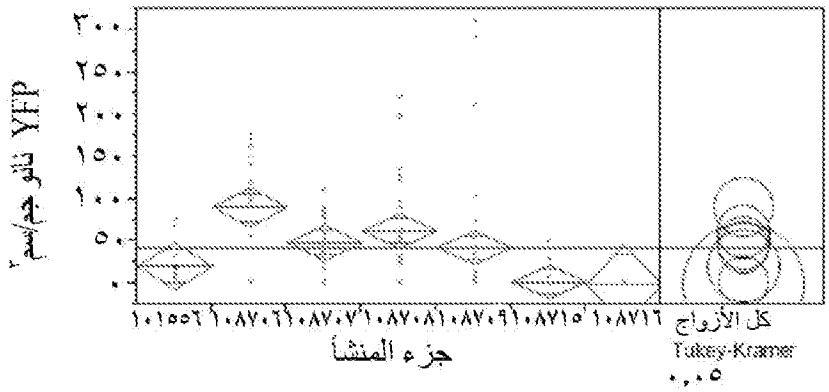
شكل ٣٩أ



شكل ٣٩ب

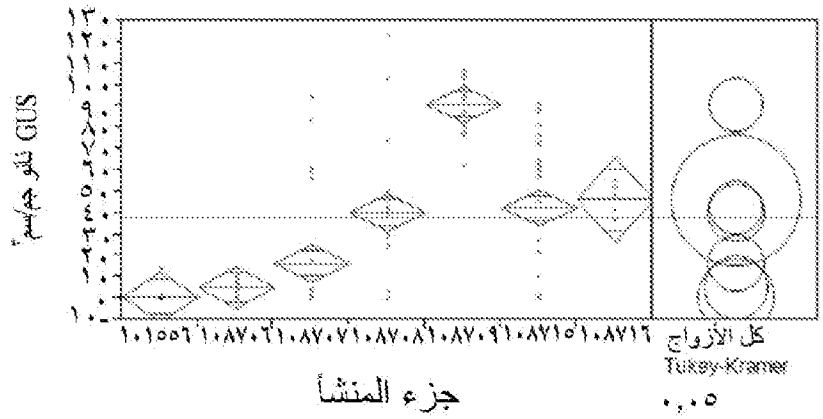

١٠٨٧١٦
١٠٨٧١٥
١٠٨٧٠٩
١٠٨٧٠٨
١٠٨٧٠٧
١٠٨٧٠٦
١٠٨٥٥٦
AAD1 نانو جم/سم٢
٢٢٠
٢١٠
٢٠٠
١٩٠
١٨٠
١٧٠
١٦٠
١٥٠
١٤٠
١٣٠
١٢٠

شكل ٣٩ج



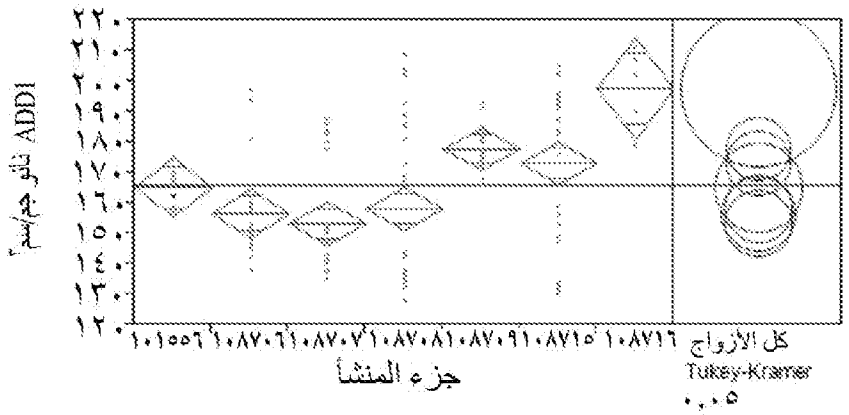
المستوى		متوسط
١٠٨٧٠٦	A	٩١,٣٨٠٩٥٢
١٠٨٧٠٨	AB	٦٣,٢٢٢٢٢٢
١٠٨٧٠٧	AB	٤٩,١٨٥١٨٥
١٠٨٧٠٩	BC	٤٣,٦٠٠٠٠٠
١٠١٥٥٦	BC	٢١,٦٦٦٦٦٧
١٠٨٧١٥	C	٣,٠٠٠٠٠٠
١٠٨٧١٦	BC	٠,٤٠٠٠٠٠

شكل ٤٠أ



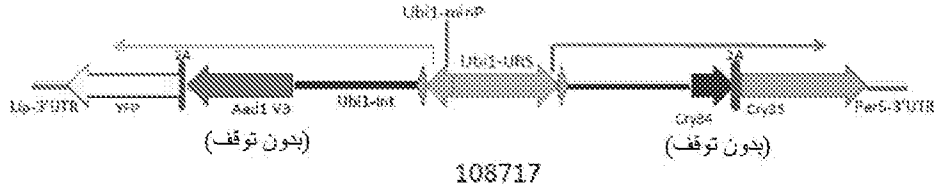
المستوى		متوسط
١٠٨٧٠٩٨		٩١,٢٠٠٠٠٠
١٠٨٧١٦	B C	٤٦,٦٠٠٠٠٠
١٠٨٧١٥	B	٤٢,٧٦٦٦٦٧
١٠٨٧٠٨	B	٤٠,٦٢٩٦٣٠
١٠٨٧٠٧	C D	١٦,٨١٤٨١٥
١٠٨٧٠٦	D	٥,٥٢٣٨١٠
١٠١٥٥٦	D	١,٠٦٦٦٦٧

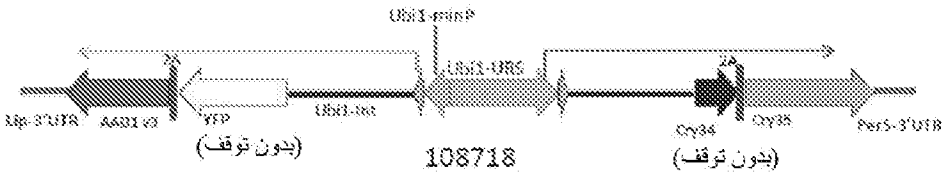
شكل ٤٠ب



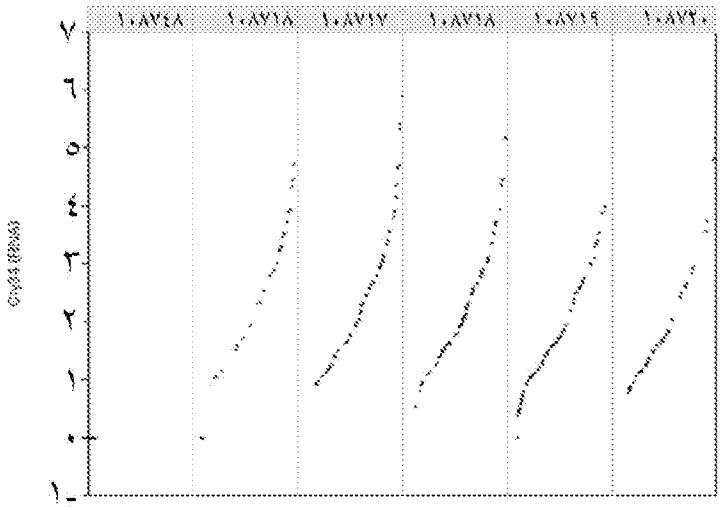
المستوى		متوسط
١٠٨٧١٦	A	١٩٧,٨٠٠٠٠
١٠٨٧٠٩	A B	١٧٨,٠٠٠٠٠
١٠٨٧١٥	A B C	١٧٣,٣٠٠٠٠
١٠١٥٥٦	B C D	١٦٥,٤٠٠٠٠
١٠٨٧٠٨	C D	١٥٨,٣٣٣٣٣
١٠٨٧٠٦	D	١٥٦,٧١٤٢٩
١٠٨٧٠٧	D	١٥٣,٤٤٤٤٤

شكل ٤٠ج

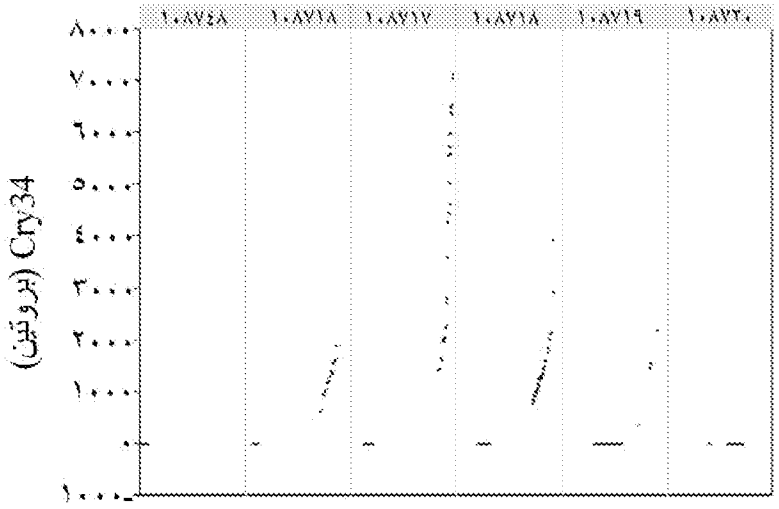

Ubi1-minP
Ubi1-URS
Ubi3-int
Cry34
Cry35
(بدون توقف)
(بدون توقف)
108717


Ubi1-minP
Ubi1-URS
Ubi3-int
Cry34
Cry35
(بدون توقف)
108718
(بدون توقف)

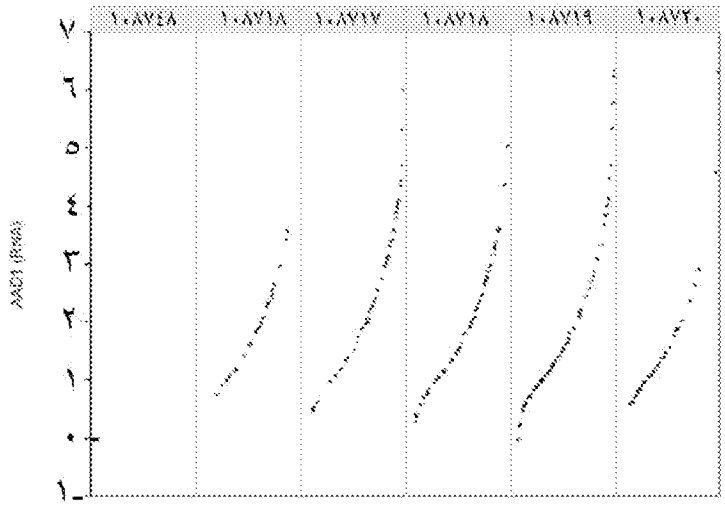
شكل ٤١



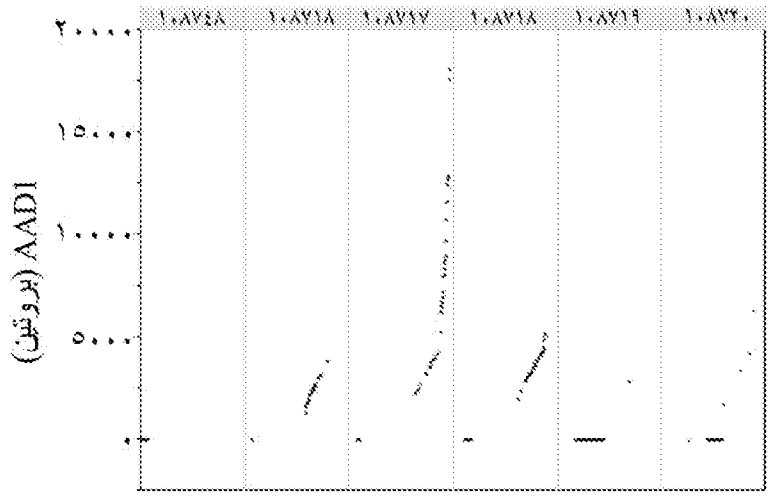
شكل ٤٢أ



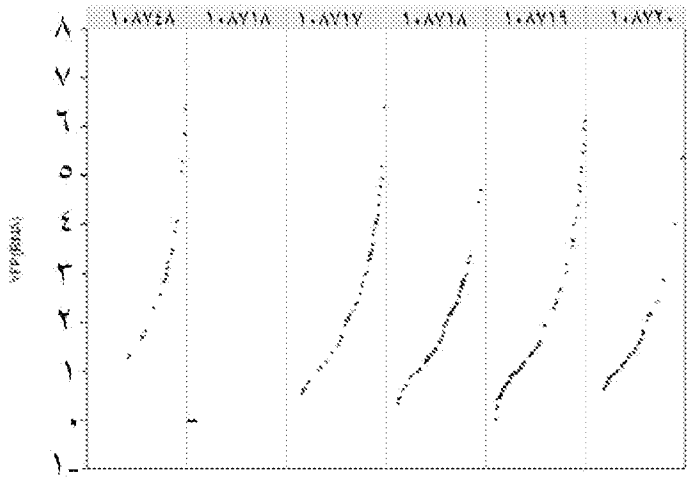
شكل ٤٢ب



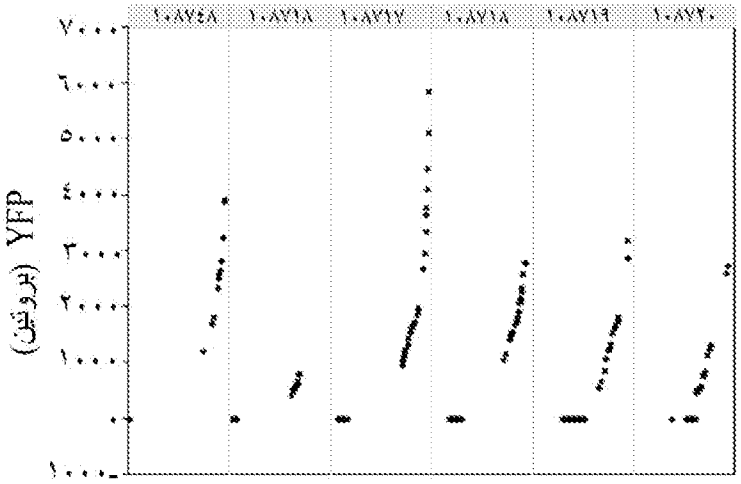
شكل ٤٣أ



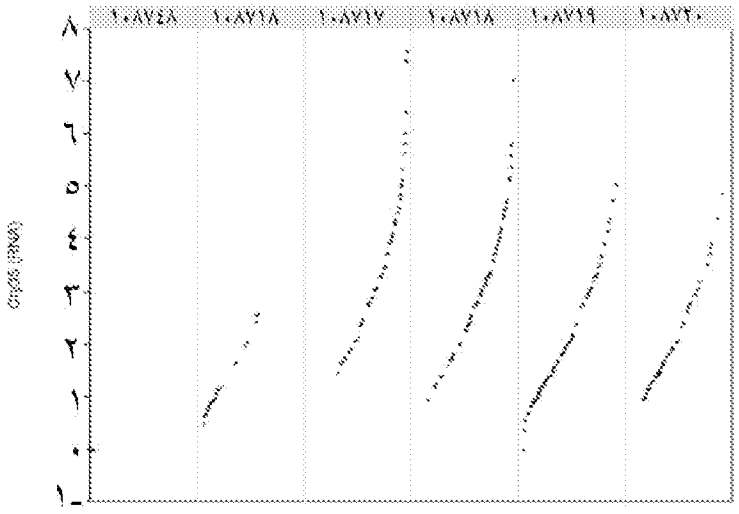
شكل ٤٣ب



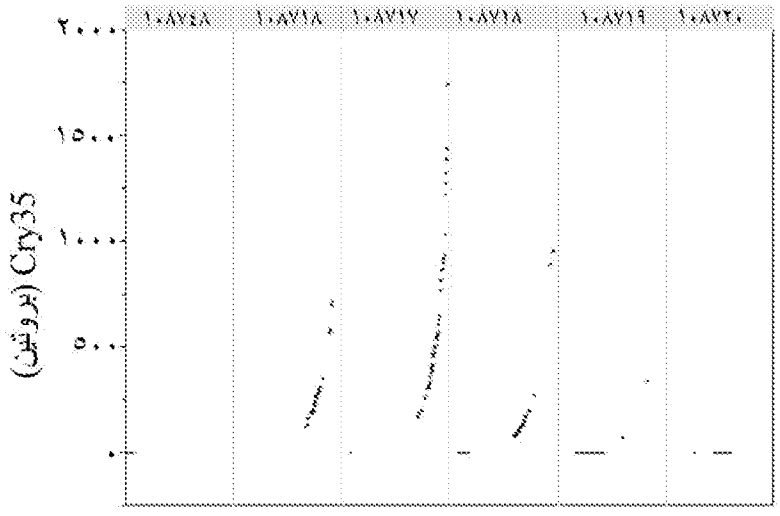
شكل ٤٤أ



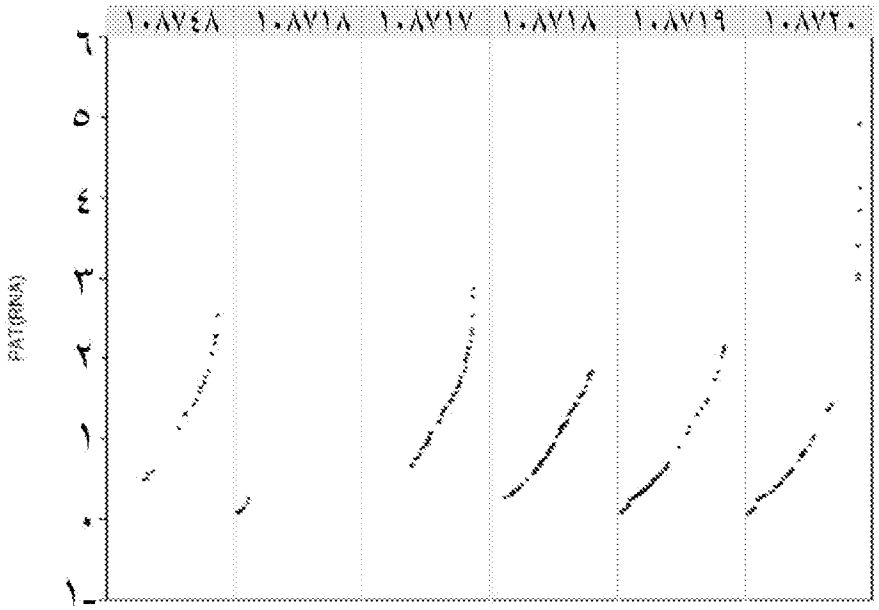
شكل ٤٤ب



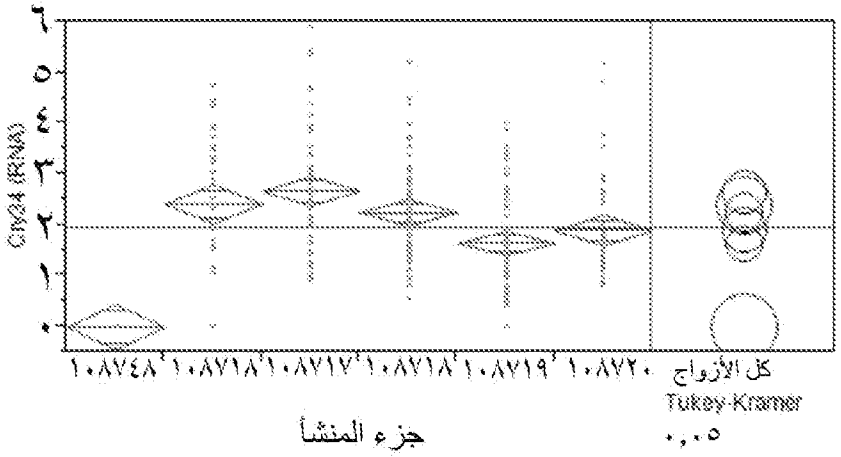
شكل ٤٥أ



شكل ٤٥ب

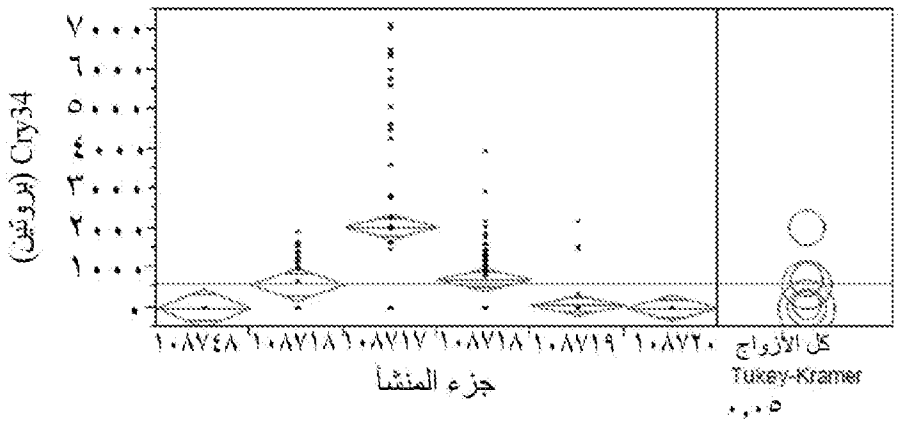


شكل ٤٦



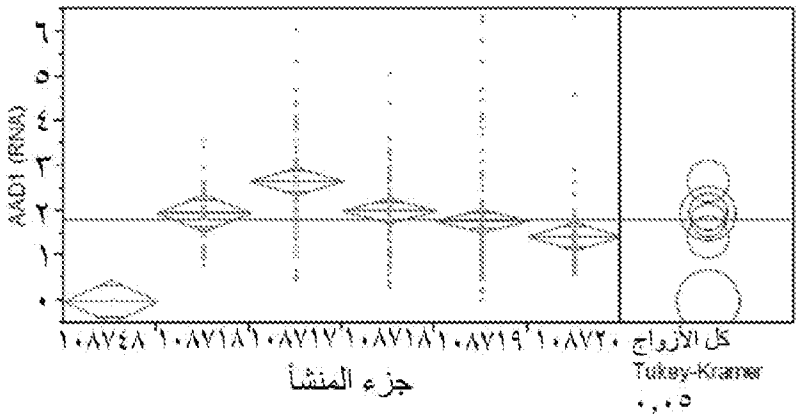
المستوى	متوسط
١٠٨٧١٧ A	٢,٦٧٧٠٣٧٠
١٠٥٨١٨ A B	٢,٤٢١٣٣٣٣
١٠٨٧١٨ A B	٢,٢٥٥٤٥٤٥
١٠٨٧٢٠ B C	١,٩٠٤٨٩٨٠
١٠٨٧١٩ C	١,٦٥٠٦٣٢٩
١٠٨٧٤٨ D	٠,٠٠٠٠٠٠٠

شكل ٤٧أ



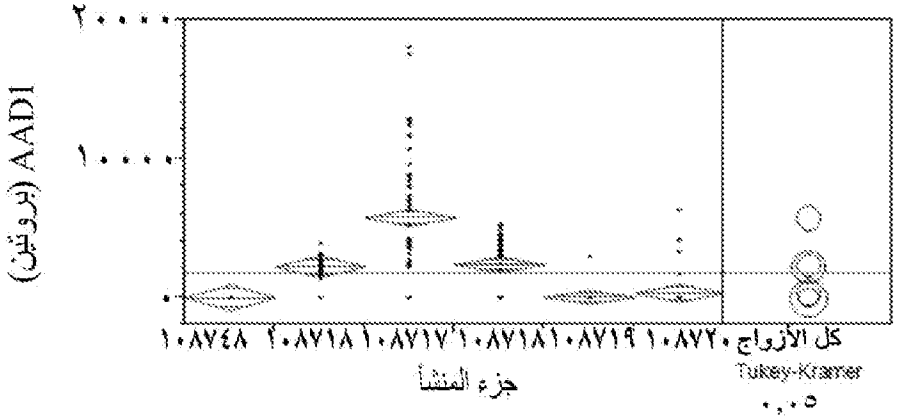
المستوى		متوسط
١٠٨٧١٧٨		٢٠٤٤,٧٢٤٨
١٠٥٨١٨	B	٧١٩,١٧٥٠
١٠٨٧١٨	BC	٥٩٦,٩٤٤١
١٠٨٧١٩	C	٦٦,٩٩٣٠
١٠٨٧٤٨	BC	٠,٠٠٠٠
١٠٨٧٢٠	C	٠,٠٠٠٠

شكل ٤٧ب



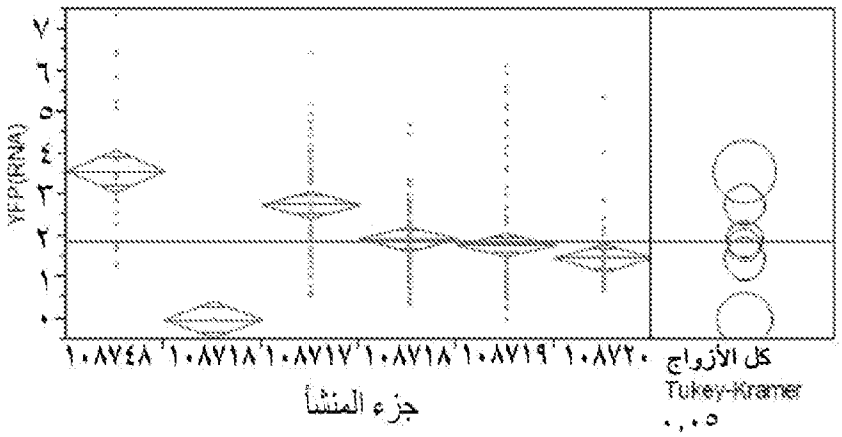
المستوى		متوسط
١٠٨٧١٧٨		٢,٦٨٤٢٥٩٣
١٠٥٨١٨	B	٢,٠٢٦٨١٨٢
١٠٨٧١٨٨	B	١,٩٧٥٦٦٦٧
١٠٨٧١٩	B	١,٨٠١٥١٩٠
١٠٨٧٢٠	B	١,٤٥٤٠٨١٦
١٠٨٧٤٨	C	٠,٠٠٠٠٠٠٠

شكل ٤٨أ



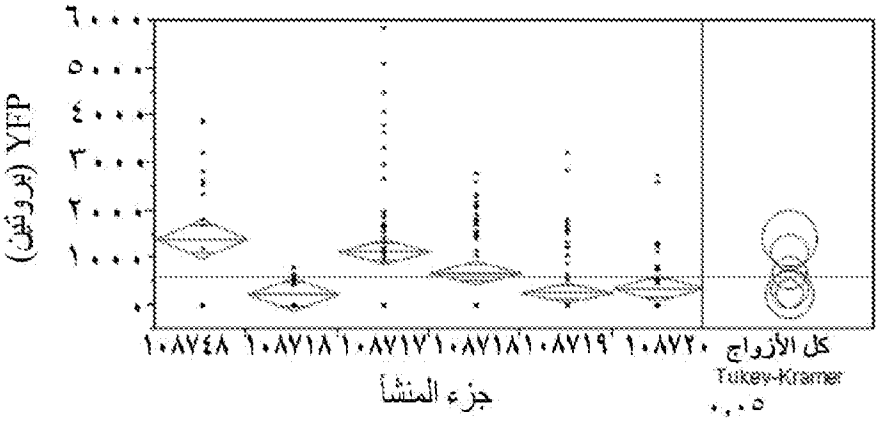
المستوى		متوسط
		٥٧٦٣,٨٧٦١
١٠٨٧١٧٨		٢٣٧٩,١٤٦٥
١٠٥٨١٨	B	٢٢٣٧,٥٣٥٠
١٠٨٧١٨	B	٣١٥,٩٠٦٣
١٠٨٧٢٠	C	٣٤,٤٧٠٨
١٠٨٧١٩	C	٠,٠٠٠٠
١٠٨٧٤٨	C	

شكل ٤٨ب



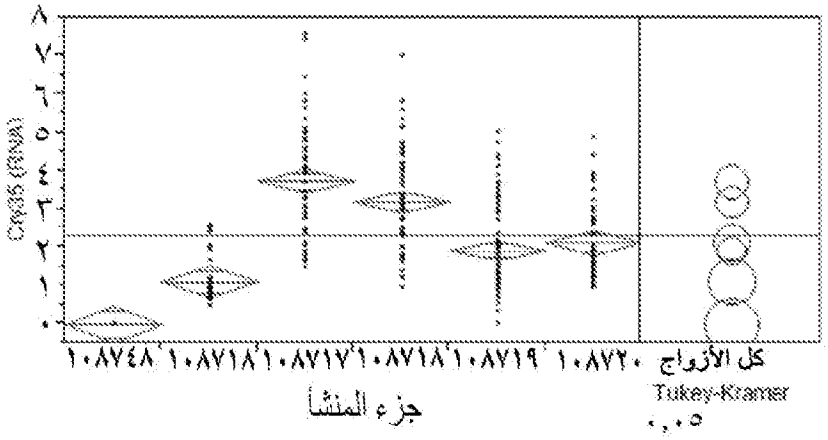
المستوى		متوسط
١٠٨٧٤٨	A	٣,٥٩٨٦٣٦٤
١٠٥٨١٧	A	٢,٧٨٢٧٧٧٨
١٠٨٧١٨	B	١,٩٥٣٣٣٣٣
١٠٨٧١٩	B	١,٨٠٥٤٤٣٠
١٠٨٧٢٠	B	١,٤٩١٨٣٦٧
١٠٨٧١٨	C	٠,٠٠٠٠٠٠٠

شكل ٤٩أ



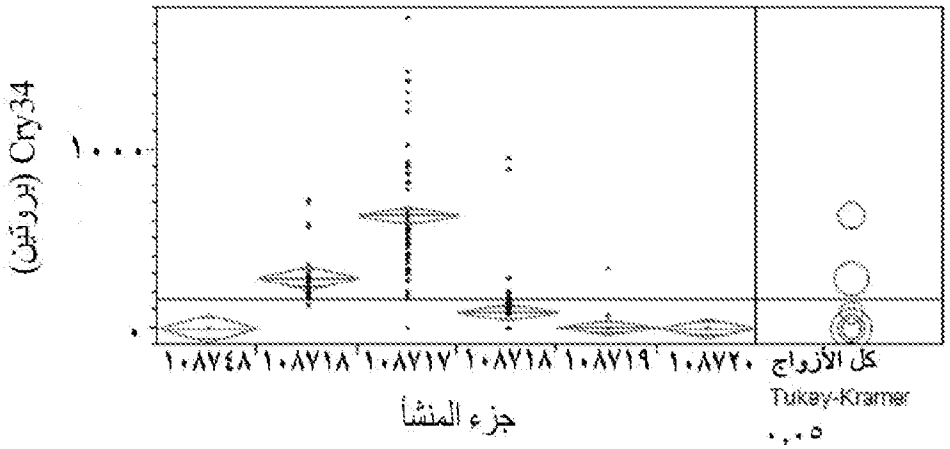
المستوى		متوسط
١٠٨٧٤٨	A	١٤٢٠,٦٨٨٣
١٠٥٨١٧	AB	١١٥٤,٠٣٥٣
١٠٨٧١٨	BC	٧٠٦,٠٤٢٦
١٠٨٧٢٠	C	٣٨١,٠٤٢٩
١٠٨٧١٩	C	٢٨٣,٥٩٥٨
١٠٨٧١٨	C	٢٥١,٦٨٢١

شكل ٤٩ب



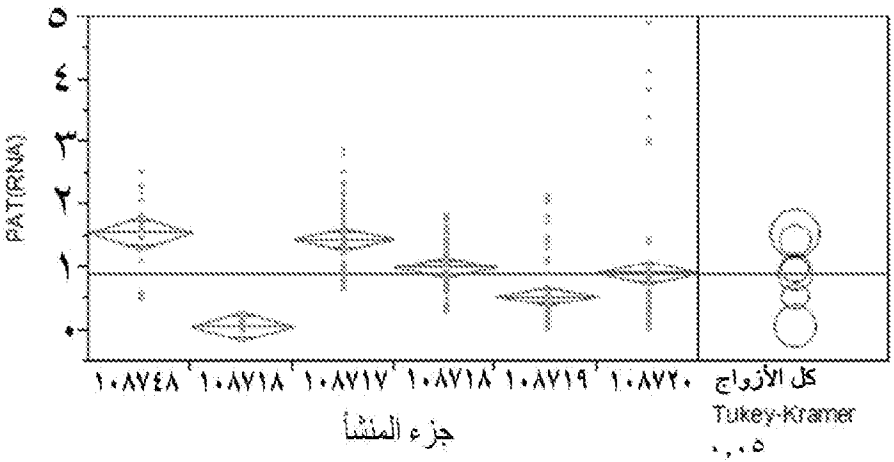
المستوى		متوسط
١٠٨٧١٧	A	٣,٧٤٤٢٥٩٣
١٠٨٧١٨	A	٣,٢٠٣٠٣٠٣
١٠٨٧٢٠	B	٢,١٣٦٥٣٠٦
١٠٨٧١٩	B	١,٩٣٠٩٣٠٢
١٠٨٧١٨	C	١,١١٩٠٠٠٠
١٠٨٧٤٨	D	٠,٠٠٠٠٠٠٠

شكل ٥٠أ



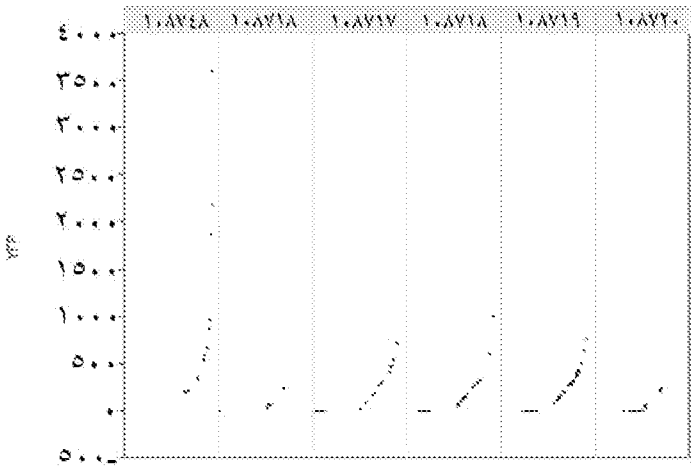
المستوى		متوسط
١٠٨٧١٧٨		٦٣٥,٨٢٥٢٠
١٠٨٧١٨	B	٢٨٣,٥٤١٧٦
١٠٨٧١٨	C	٩٠,٩٧٠١٦
١٠٨٧١٩	C	٤,٩١٢١٤
١٠٨٧٤٨	C	٠,٠٠٠٠٠
١٠٨٧٢٠	C	٠,٠٠٠٠٠

شكل ٥٠ب

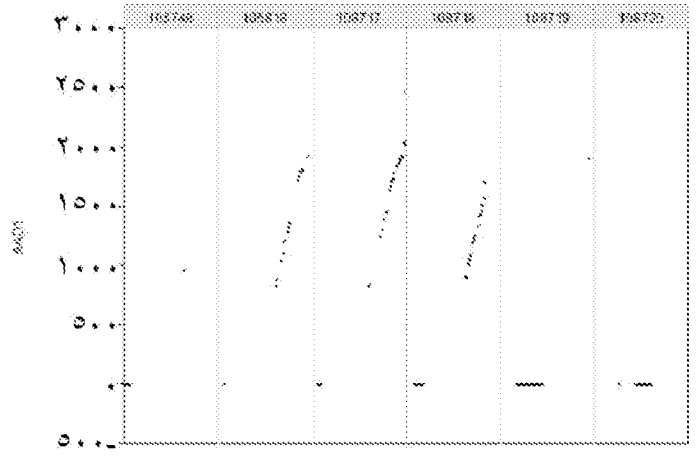


المستوى		متوسط
١٠٥٧٤٨	A	١,٥٦٢٧٢٧٣
١٠٨٧١٧	A	١,٤٦١٤٨١٥
١٠٨٧١٨	B	١,٠١٣١٨١٨
١٠٨٧٢٠	B	٠,٩٢٥١٠٢٠
١٠٨٧١٩	C	٠,٠٧٠٦٦٦٧
١٠٨٧١٨	D	

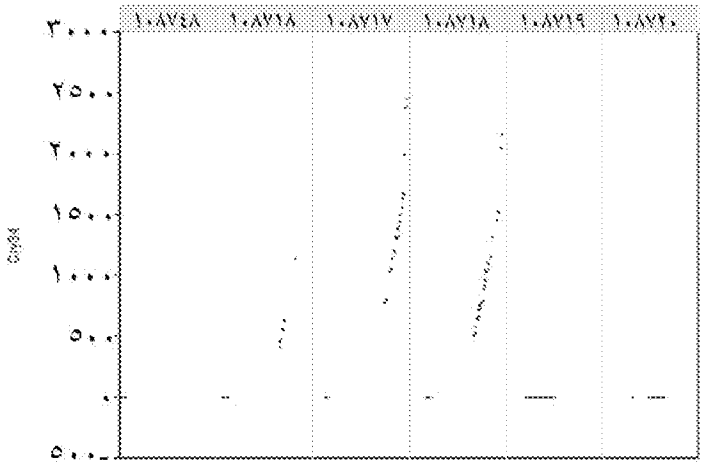
شكل ٥١



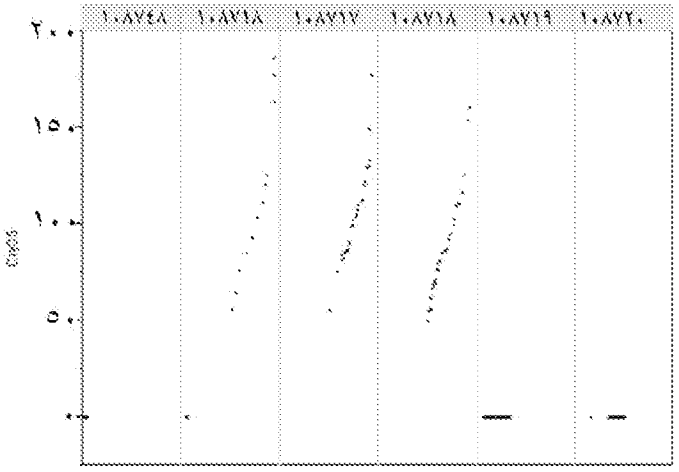
شكل ٥٢أ



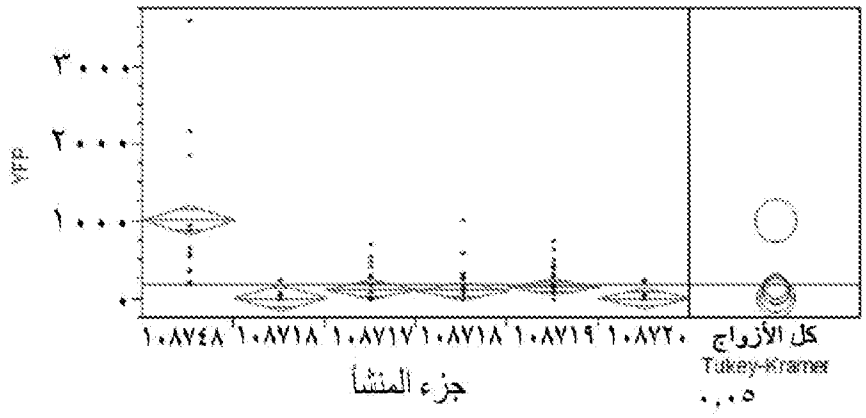
شكل ٥٢ب



شكل ٥٢ج

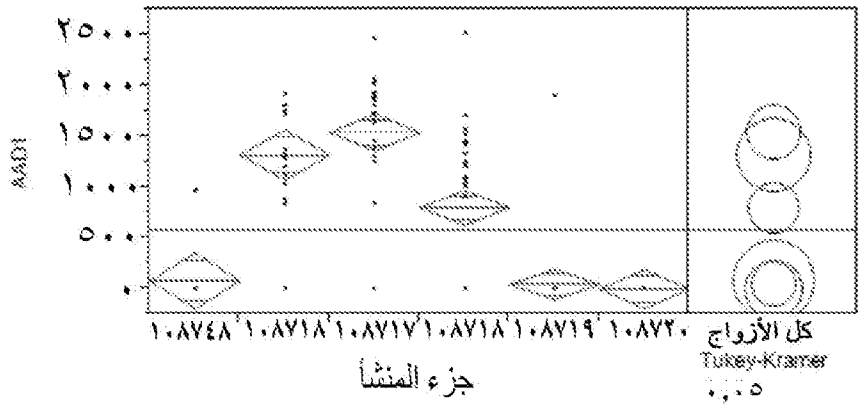


شكل ٥٢د



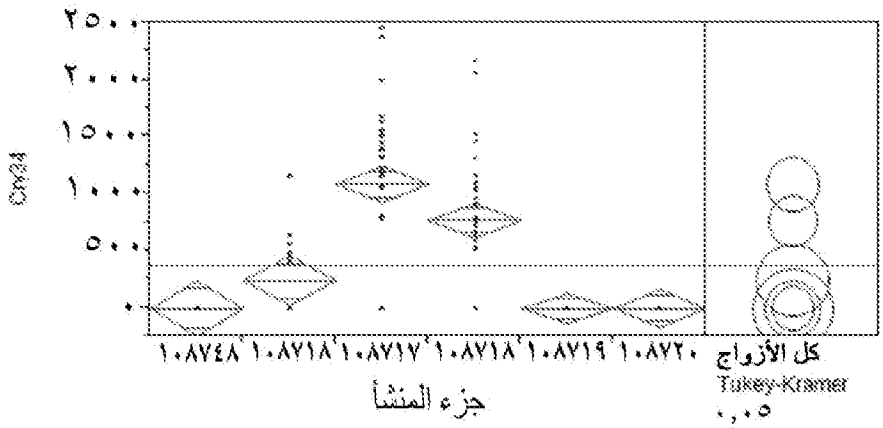
المستوى	متوسط
١٠٥٧٤٨٨	١٠٣٣,٤٦٦٧
١٠٨٧١٩ B	١٦٩,٨٤٣٩
١٠٨٧١٧ C	١٣٦,١٨١٥
١٠٨٧١٨ B	١١٩,٠٦١٣
١٠٥٨١٨ C	٢٧,٥١٣٣
١٠٨٧٢٠ B	٢٢,٤٨٤٠

شكل ٥٣أ



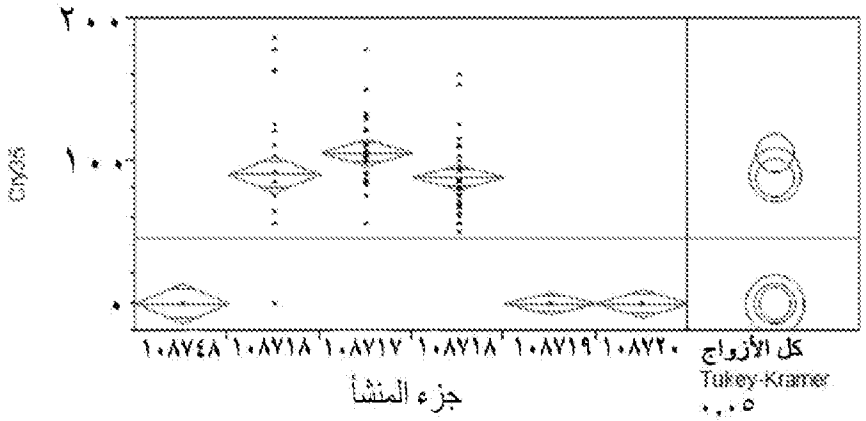
المستوى		متوسط
١٠٨٧١٧٨		١٥٤٤,٦٩٦٣
١٠٥٨١٨٨		١٣٢٣,٨٠٠٠
١٠٨٧١٨	B	٨٠٢,٥٠٠٠
١٠٥٧٤٨	C	٨٠,٨٩١٧
١٠٨٧١٩	C	٤٦,٤٩٢٧
١٠٨٧٢٠	C	٠,٠٠٠٠

شكل ٣٥ب



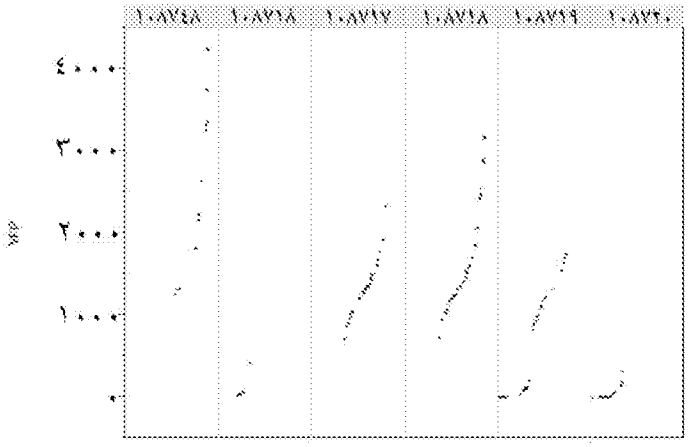
المستوى		متوسط
١٠٨٧١٧٨		١٠٨٩,١٧٧٨
١٠٨٧١٨٨		٧٦٩,٨٠٦٥
١٠٥٨١٨	B	٢٤٦,٠٥٣٣
١٠٥٧٤٨	B	٠,٠٠٠٠
١٠٨٧١٩	B	٠,٠٠٠٠
١٠٨٧٢٠	B	٠,٠٠٠٠

شكل ٥٣ج

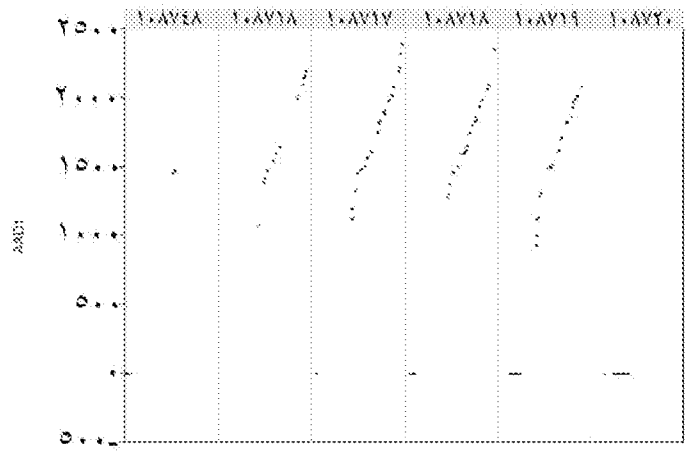


	المستوى	متوسط
١٠٨٧١٧	A	١٠٦,٠٨٥١٩
١٠٥٨١٨	A	٩٠,٧٤٦٦٧
١٠٨٧١٨	A	٨٨,٨٠٣٢٣
١٠٥٧٤٨	B	٠,٠٠٠٠
١٠٨٧١٩	B	٠,٠٠٠٠
١٠٨٧٢٠	B	٠,٠٠٠٠

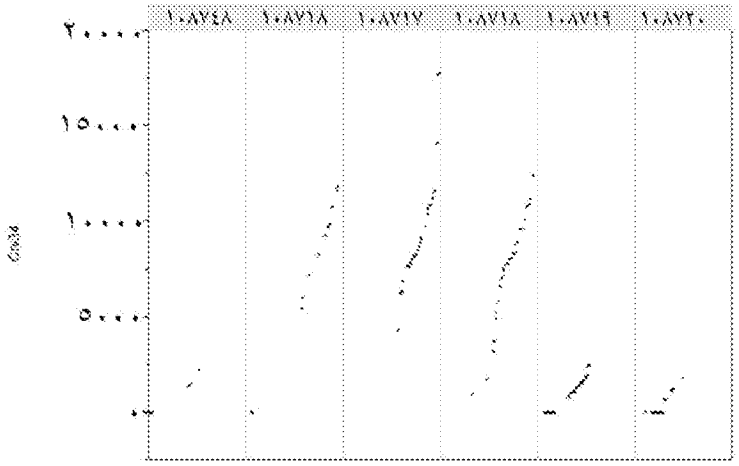
شكل ٥٣د



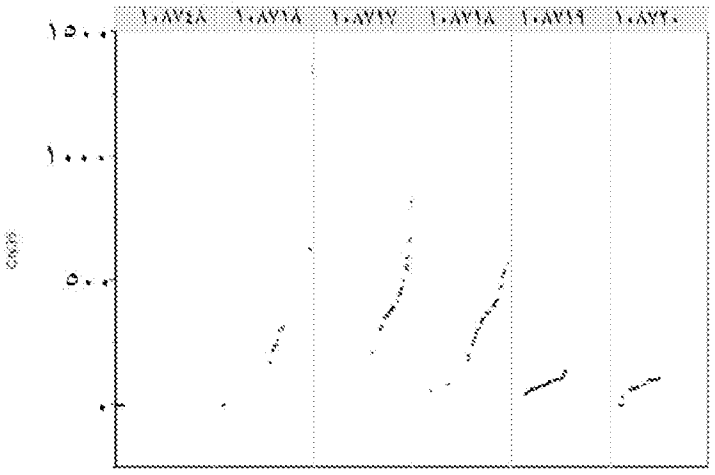
شكل ٤٥أ



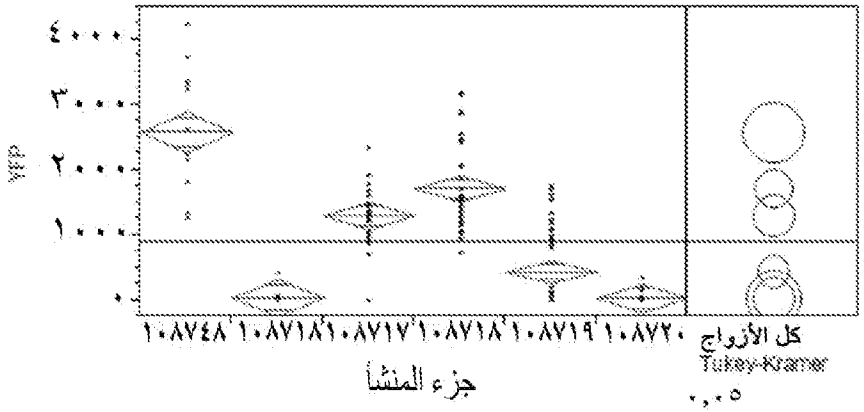
شكل ٤٥ب



شكل ٥٤ج

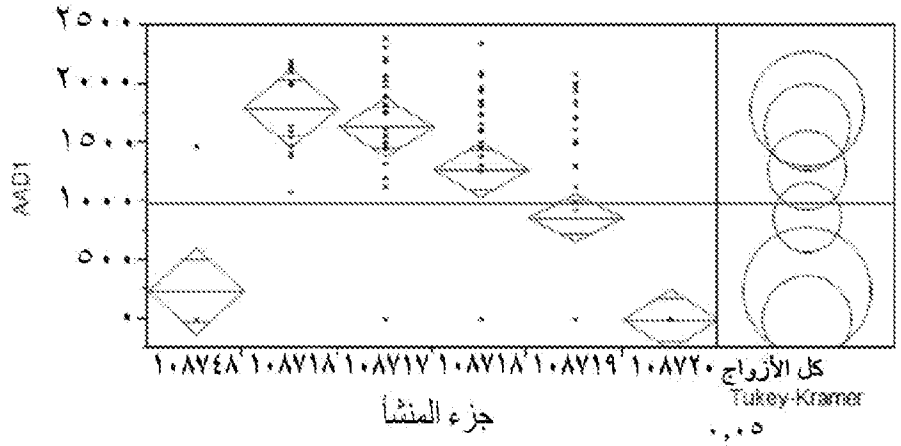


شكل ٥٤د



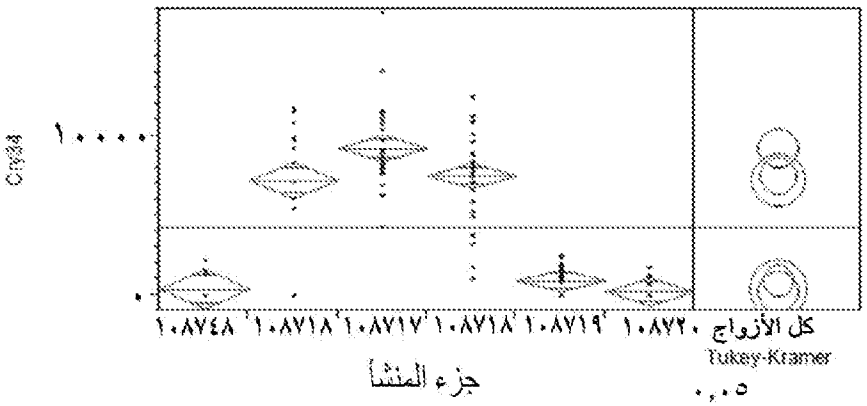
المستوى		متوسط
١٠٥٧٤٨	A	٢٥٨٩,٦٣٣٣
١٠٨٧١٨	B	١٧٢١,٩٥٨١
١٠٨٧١٧	B	١٣٠٥,٢٧٤١
١٠٨٧١٩	C	٤٣٨,٨٨٢٩
١٠٥٨١٨	C	٤٣,٦٢٦٧
١٠٨٧٢٠	C	٣٧,٤٤٠٠

شكل ٥٥أ



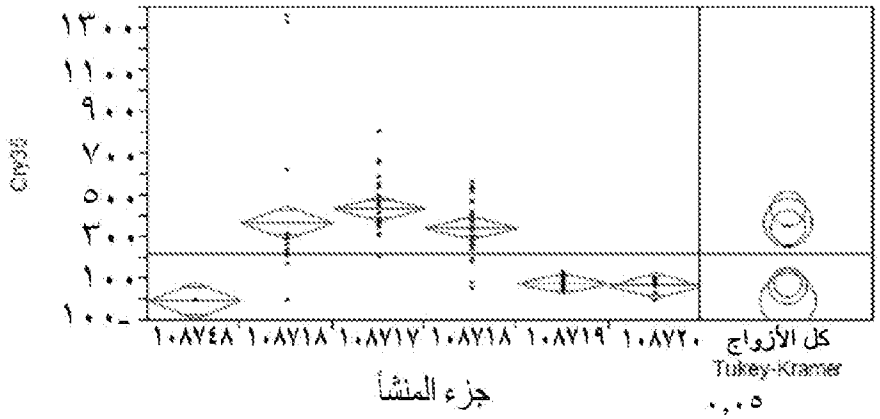
المستوى		متوسط
١٠٥٨١٨	A	١٨٠٣,٩٨٦٧
١٠٨٧١٧	A	١٦٤٢,٤٣٧٠
١٠٨٧١٨	A B	١٢٧٩,١٦٧٧
١٠٨٧١٩	B	٨٦٩,٠٧٠٧
١٠٥٧٤٨	C	٢٤٤,٤٠٨٣
١٠٨٧٢٠	C	٠,٠٠٠٠

شكل ٥٥ب



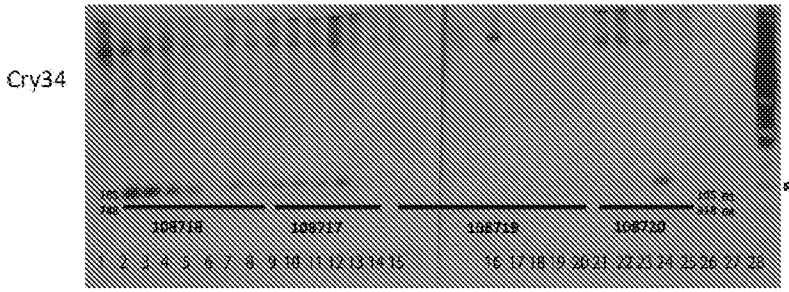
	المستوى	متوسط
١٠٨٧١٧	A	٩٢٨٥,٧٣٧٠
١٠٨٧١٨	B	٧٥٤٤,٧٤٨٤
١٠٥٨١٨	A B	٧٢٥٨,١٥٣٣
١٠٨٧١٩	C	٩٥٠,٥٣٤١
١٠٥٧٤٨	C	٤٢٢,٤٥٠٠
١٠٨٧٢٠	C	٢٤٧,٩٤٦

شكل ٥٥ج

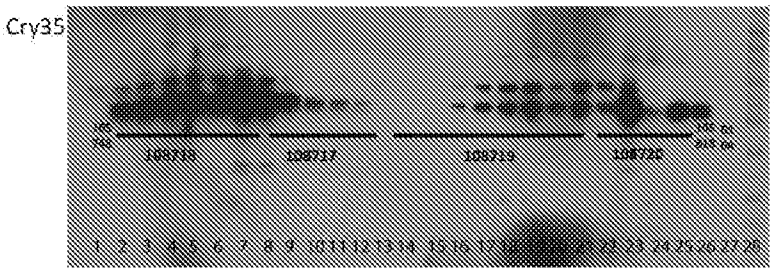


المستوى		متوسط
١٠٨٧١٧	A	٤٤١,١٠٧٤١
١٠٥٨١٨	A	٣٧٣,٣٤٦٦٧
١٠٨٧١٨	A	٣٤٨,٤٤٨٣٩
١٠٨٧١٩	B	٨٣,٠٤٦٣٤
١٠٨٧٢٠	B	٧١,٨٠٨٠٠
١٠٥٧٤٨	B	٠,٠٠٠٠٠

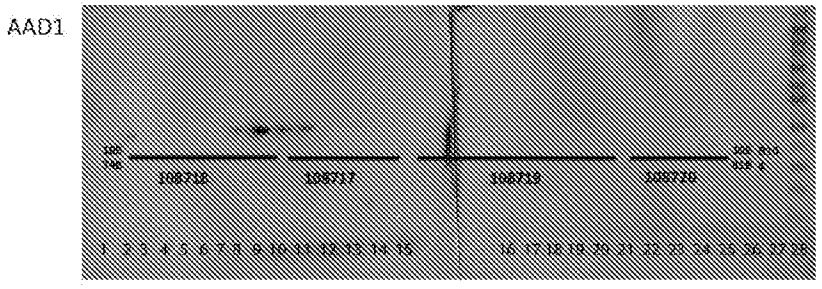
شكل ٥٥د



شكل ٥٦أ



شكل ٥٦ب



شكل ٥٦ج

مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشرط تسديد المقابل المالي السنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية

صادرة عن
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية ، مكتب البراءات السعودي
ص ب ٦٠٨٦ ، الرياض ١١٤٤٢ ، المملكة العربية السعودية
بريد الكتروني: patents@kacst.edu.sa