



(21) 申請案號：105125967

(22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 15 日

(51) Int. Cl. : C12N15/66 (2006.01)

C12N15/82 (2006.01)

(30) 優先權：2015/09/22 美國

62/221,666

(71) 申請人：道禮責任有限公司 (美國) DOW AGROSCIENCES LLC (US)  
美國(72) 發明人：古波塔 曼朱 GUPTA, MANJU (US) ; 班尼特 莎拉 BENNETT, SARA (US) ; 華  
登 安德魯 F WORDEN, ANDREW F. (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：26 項 圖式數：2 共 77 頁

## (54) 名稱

用於轉殖基因表現之植物啟動子及 3' UTR

PLANT PROMOTER AND 3'UTR FOR TRANSGENE EXPRESSION

## (57) 摘要

本發明係關於用於促進植物或植物細胞中核苷酸序列之轉錄及轉譯之組合物及方法，其利用來自阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)泛素 C9 基因之 3'UTR。一些實施例係關於來自阿拉伯芥泛素 C9 基因之 3'UTR，其在植物中功能為終止可以操作方式連接的核苷酸序列之轉錄。

This disclosure concerns compositions and methods for promoting transcription and translation of a nucleotide sequence in a plant or plant cell, employing a 3'UTR from *Arabidopsis thaliana* Ubiquitin C9 gene. Some embodiments relate to a 3' UTR from a *Arabidopsis thaliana* Ubiquitin C9 gene that functions in plants to terminate transcription of operably linked nucleotide sequences.

指定代表圖：

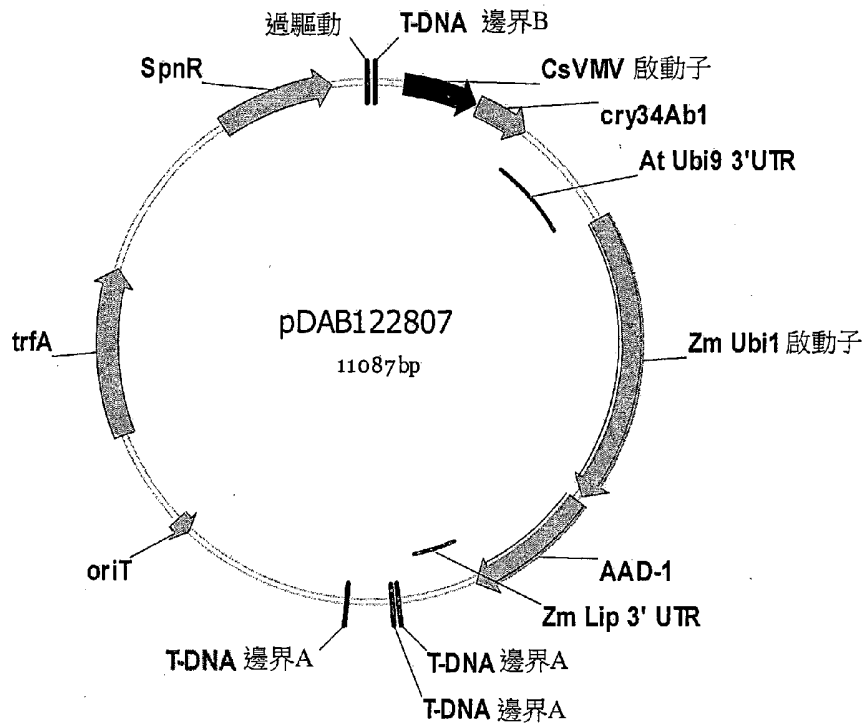


圖 1

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】

用於轉殖基因表現之植物啟動子及3'UTR

PLANT PROMOTER AND 3' UTR FOR TRANSGENE  
EXPRESSION

## 相關申請案之交叉參考

本申請案主張2015年9月22日申請之美國臨時專利申請案序號62/221666之優先權，該案之整體揭示內容以引用的方式併入本文中。

以引用以電子檔呈送之材料的方式併入

以其整體引用的方式併入的是與本文同時呈送並識別為如下之電腦可讀核苷酸/胺基酸序列表：一創建於2015年9月21日之命名為「78149-US-PSP-09212015-Sequence \_ST25.txt」之12.0 KB ACII(文本)文檔。

## 【先前技術】

許多植物物種能夠藉由轉殖基因經轉形以農業上引入期望的特徵或特性。所得植物物種可發展及/或改造成具有特定期望的特徵。一般而言，期望的特徵包括，例如，提高營養價值品質，增加產量，賦予害蟲或疾病抗性，增加乾旱及應力耐受性，提高園藝品質(例如，色素沉澱及生長)，賦予除草劑耐受性，能夠產生來自植物之工業上有用之化合物及/或材料，及/或能夠製備醫藥品。

包含堆疊在一個基因組位點的多個轉殖基因之轉殖基因植物物種係經由植物轉形技術產生。植物轉形技術導致引入轉殖基因至植物細胞中，回收包含植物基因組中轉殖基因之經穩定整合之複本之可育

轉殖基因植物，及於隨後轉殖基因經由植物基因組之轉錄及轉譯而表現導致具有期望的特徵及表現型的轉殖基因植物。然而，期望允許產生轉殖基因植物物種以高度表現經改造為特徵堆疊之多個轉殖基因的機制。

同樣地，期望允許轉殖基因於植物之特定組織或器官中表現之機制。例如，植物對土壤傳播的病原體感染抗性之增加可藉由以抗病原體基因轉形植物基因組使得抗病原體蛋白質穩健地表現於植物根中來達成。或者，可期望於處在特定生長或發育階段諸如(例如)細胞分裂或伸長中之植物組織中表現轉殖基因。另外，可期望在植物之葉及莖組織中表現轉殖基因以提供抗除草劑耐受性或抗上述地面昆蟲及害蟲抗性。

因此，存在對可驅動特異性植物組織中轉殖基因之期望表現水平之新穎基因調控元件的需求。

### 【發明內容】

在本發明之實施例中，其揭示內容係關於一種核酸載體，其包含可以操作方式與多連接子序列連接之3' UTR、非阿拉伯芥(*non-Arabidopsis thaliana*)泛素C9基因、或多連接子序列與非阿拉伯芥泛素C9基因之組合。在該實施例之此等態樣中，該3' UTR包含與SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性之多核苷酸序列。其他實施例包括包含長度為664 bp的多核苷酸之3' UTR。亦包括與SEQ ID NO:1之3' UTR共有80%、85%、90%、92.5%、95%、97.5%、99%或99.9%序列同一性之多核苷酸之實施例。實施例包括核酸載體，其進一步包含編碼可選擇標誌之序列。亦考慮核酸載體之實施例，其中該3' UTR係可以操作方式與轉殖基因連接。此轉殖基因之實例包括賦予殺昆蟲劑抗性、除草劑耐受性、氮利用效率、水利用效率或營養品質之可選擇標誌或基因產物。進一步考慮核酸載體之實施例，其中該3' UTR係可以操作

方式與RNAi表現多核苷酸連接。

在其他態樣中，本發明係關於核酸(或多核苷酸)，其包含與SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%、92.5%、95%、97.5%、99%及99.9%序列同一性之啟動子多核苷酸序列。因此，將此啟動子併入至包含SEQ ID NO:1之3' UTR之核酸載體中。在該實施例之態樣中，該啟動子(例如SEQ ID NO:2)係可以操作方式與多連接子或轉殖基因之5'端連接，及該3' UTR係可以操作方式與多連接子或轉殖基因之3'端連接。該實施例中進一步包括核酸載體，其中該啟動子進一步包含內含子或5' UTR。於隨後，包含SEQ ID NO:2之啟動子及SEQ ID NO:1之3' UTR之核酸載體驅動具有組成性組織特異性表現之轉殖基因之表現。

在其他態樣中，本發明係關於一種植物，其包含可以操作方式與轉殖基因連接之與SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性之多核苷酸序列。因此，該植物為單子葉或雙子葉植物。植物之具體實例包括玉米、小麥、稻米、蜀黍、燕麥、黑麥、香蕉、甘蔗、大豆、棉花、阿拉伯芥(*Arabidopsis*)、菸草、向日葵及芥花菜(*canola*)。在實施例中，可轉形此等植物，其中轉殖基因係插入至該植物之基因組中。在額外的實施例中，該植物包含啟動子，該啟動子包含與SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%、92.5%、95%、97.5%、99%或99.9%序列同一性之多核苷酸序列。在此等實施例中，SEQ ID NO:1長度為664 bp。在該實施例之一個態樣中，3' UTR係可以操作方式與轉殖基因連接。在其他實施例中，該植物包含3'UTR，該3'UTR包含與SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%、92.5%、95%、97.5%、99%或99.9%序列同一性之多核苷酸序列。在此等實施例中，SEQ ID NO:1長度為664 bp。在該實施例之一個態樣中，SEQ ID NO:1之3'UTR係可以操作方式與轉殖基因連接。另外，該等實施例係關於一種包含SEQ ID

NO:2之啟動子之植物或關於一種阿拉伯芥泛素C9啟動子，其中轉殖基因表現係組成性的。同樣地，該等實施例係關於一種包含SEQ ID NO:1之3'UTR之植物，其中轉殖基因表現為組成性或組織特異性表現，如藉由用於驅動該轉殖基因之啟動子來判定。

在其他態樣中，本發明係關於一種產生轉殖基因植物細胞之方法。此方法利用以包含可以操作方式與至少一個受關注多核苷酸序列連接之阿拉伯芥泛素C9 3'UTR之基因表現盒轉形植物細胞。接下來，該方法揭示分離包含基因表現盒之該轉形植物細胞。另外，該方法考慮產生包含可以操作方式與至少一個受關注多核苷酸序列連接之阿拉伯芥泛素C9 3'UTR之轉殖基因植物細胞。同樣地，該方法包括使轉殖基因植物細胞再生成為轉殖基因植物。此外，該方法包括獲得轉殖基因植物，其中該轉殖基因植物包含基因表現盒，該基因表現盒包含可以操作方式與至少一個受關注多核苷酸序列連接之阿拉伯芥泛素C9 3'UTR。在此種實施例中，轉形植物細胞之該方法係利用植物轉形方法來進行。在其他實施例中，轉形植物細胞之該方法導致穩定地整合至轉殖基因植物細胞之基因組中的受關注多核苷酸序列。在此等實施例之態樣中，該阿拉伯芥泛素C9 3'UTR包含SEQ ID NO:1之多核苷酸。

在其他態樣中，本發明係關於一種經分離的多核苷酸，其包含與SEQ ID NO:1之多核苷酸具有至少80%、85%、90%、92.5%、95%、97.5%、99%或99.9%序列同一性之核酸序列。在一個實施例中，該經分離的多核苷酸進一步包含編碼多肽之開放閱讀框多核苷酸；及啟動子序列。在另一個實施例中，SEQ ID NO:1之多核苷酸長度為664 bp。

在本發明之實施例中，其揭示內容係關於一種核酸載體，其包含可以操作方式與以下連接之3'UTR：多連接子序列；非阿拉伯芥泛

素C9樣基因；或多連接子序列與非阿拉伯芥泛素C9樣序列之組合，其中該3' UTR包含與SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性之多核苷酸序列。在一些實施例中，該3'UTR長度為664 bp。在額外的實施例中，該3'UTR係由與SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性之多核苷酸序列組成。在其他實施例中，該3'UTR終止編碼可選擇標誌之多核苷酸之表現。在其他實施例中，該3'UTR係可以操作方式與轉殖基因連接。在該實施例之態樣中，該轉殖基因編碼會賦予殺昆蟲劑抗性、除草劑耐受性、氮利用效率、水利用效率或營養品質之可選擇標誌或基因產物。提供SEQ ID NO:1之3'UTR併與啟動子使用，該啟動子多核苷酸序列包含與SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性之序列，其中該啟動子多核苷酸序列係可以操作方式與該多連接子或該轉殖基因連接。在其他實施例中，提供SEQ ID NO:1之3'UTR併與任何已知植物啟動子序列使用，該啟動子序列包含與SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性之序列或阿拉伯芥泛素C9啟動子序列。在另一實施例中，SEQ ID NO:1之3'UTR係用於組成性或組織特異性表現。

在又一實施例中，本發明提供一種植物，其包含可以操作方式與轉殖基因連接或與連接子序列連接之與SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性之多核苷酸序列。根據該實施例，該植物係選自由玉米、小麥、稻米、蜀黍、燕麥、黑麥、香蕉、甘蔗、大豆、棉花、阿拉伯芥、菸草、向日葵及芥花菜組成之群。隨後，在一些實施例中，包含與SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性之該多核苷酸序列之植物可為玉米(*Zea mays*)植物。在其他實施例中，可以操作方式與SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性之多核苷酸序列連接之該轉殖基因係插入至植物之基因組中。在一些實施例中，與SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性之該多核苷酸序列為3'UTR及該3'UTR係可以操作方式與轉殖基因連接。在其他實施例中，該植物包含包含SEQ ID NO:2

之啟動子序列或與SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性之啟動子序列，其中該啟動子序列係可以操作方式與轉殖基因連接。在另一實施例中，與SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性之該多核苷酸序列係用於具有組成性或組織特異性表現之轉殖基因之表現。在另一實施例中，與SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性之該多核苷酸序列長度為664 bp。

在一個實施例中，本發明提供一種產生轉殖基因植物細胞之方法，該方法包括以下步驟：以包含可以操作方式與至少一個受關注多核苷酸序列連接之阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR之基因表現盒轉形植物細胞；分離包含基因表現盒之該轉形植物細胞；及，產生包含可以操作方式與至少一個受關注多核苷酸序列連接之阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR之轉殖基因植物細胞。在其他實施例中，轉形植物細胞之該步驟係利用植物轉形方法來進行。植物轉形方法可選自由農桿菌 (*Agrobacterium*)介導轉形法、基因槍轉形法、碳化矽轉形法、原生質體轉形法及脂質體轉形法組成之群。在其他實施例中，受關注多核苷酸序列於遍及轉殖基因植物細胞中組成性表現。在一些實施例中，受關注多核苷酸序列穩定地整合至轉殖基因植物細胞之基因組中。因此，產生轉殖基因植物細胞之方法可進一步包括以下步驟：使轉殖基因植物細胞再生成為轉殖基因植物；及，獲得轉殖基因植物，其中該轉殖基因植物包含基因表現盒，該基因表現盒包含可以操作方式與至少一個受關注多核苷酸序列連接之SEQ ID NO:1之阿拉伯芥泛素C9基因之3'UTR。在一個實施例中，該轉殖基因植物細胞為單子葉轉殖基因植物細胞或雙子葉轉殖基因植物細胞。例如，該雙子葉轉殖基因植物細胞可選自由芥菜植物細胞、菸草植物細胞、大豆植物細胞、芥花菜植物細胞及棉花植物細胞組成之群。另外，該單子葉轉殖基因植物細胞係選自由玉米植物細胞、稻米植物細胞及小麥植物細胞組成之

群。用於該方法中之阿拉伯芥泛素C9基因3' UTR可包含SEQ ID NO:1之多核苷酸。在實施例中，阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR可進一步包含可以操作方式與SEQ ID NO:1之3'端連接之第一受關注多核苷酸序列。

在一個實施例中，本發明提供一種在植物細胞中表現受關注多核苷酸序列之方法，該方法包括將可以操作方式與阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR連接之受關注多核苷酸序列引入至植物細胞中。在一些實施例中，藉由植物轉形方法將可以操作方式與阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR連接之受關注多核苷酸序列引入至植物細胞中。因此，植物轉形方法可選自由農桿菌介導轉形法、基因槍轉形法、碳化矽轉形法、原生質體轉形法及脂質體轉形法組成之群。在實施例中，受關注多核苷酸序列係遍及植物細胞中組成性表現。在一些實施例中，受關注多核苷酸序列係穩定地整合至植物細胞之基因組中。因此，轉殖基因植物細胞為單子葉植物細胞或雙子葉植物細胞。作為一實例，該雙子葉植物細胞係選自由芥菜植物細胞、菸草植物細胞、大豆植物細胞、芥花菜植物細胞及棉花植物細胞組成之群。另外，該單子葉植物細胞係選自由玉米植物細胞、稻米植物細胞及小麥植物細胞組成之群。

在一個實施例中，本發明提供包含阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR之轉殖基因植物細胞。在一些實施例中，該轉殖基因植物包括轉殖基因品系。在該實施例之一個態樣中，該轉殖基因品系包括農藝特徵。因此，該農藝特徵係選自由殺昆蟲劑抗性特徵、除草劑耐受性特徵、氮利用效率特徵、水利用效率特徵、營養品質特徵、DNA結合特徵、可選擇標誌特徵、小RNA特徵或其任何組合組成之群。在其他實施例中，該農藝特徵包括除草劑耐受性特徵。在該實施例之一個態樣中，該除草劑耐受性特徵包括*aad-1*編碼序列。在一些實施例中，該轉殖基因植物細胞產製商品。該商品為所選蛋白質濃縮物、蛋白質分離

物、穀粒、膳食、麵粉、油或纖維。在一個實施例中，該轉殖基因植物細胞係選自由雙子葉植物細胞或單子葉植物細胞組成之群。因此，該單子葉植物細胞為玉米植物細胞。在其他實施例中，阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR包含與SEQ ID NO:1之多核苷酸具有至少90%序列同一性之多核苷酸。在又一實施例中，該阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR長度為664 bp。在其他實施例中，該阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR係由SEQ ID NO:1組成。在其他實施例中，該阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR係用於以組成性或組織特異性方式表現農藝特徵。

本發明提供一種經分離的多核苷酸，其包含與SEQ ID NO:1之多核苷酸具有至少90%序列同一性之核酸序列。在一些實施例中，該經分離的多核苷酸驅動組成性或組織特異性表現。在其他實施例中，該經分離的多核苷酸於植物細胞中具有表現活性。在實施例中，該經分離的多核苷酸包含編碼多肽之開放閱讀框多核苷酸；及啟動子序列。其他實施例包括經分離的多核苷酸，其包含與SEQ ID NO:1之多核苷酸具有至少90%序列同一性之核酸序列，其中SEQ ID NO:1之該多核苷酸長度為664 bp。

自若干實施例之以下詳細描述將更明瞭前述及其他特徵，參考附圖繼續進行詳細描述。

### 【圖式簡單說明】

圖1：該圖為質體pDAB122807之示意圖，其包含SEQ ID NO:2之木薯葉脈花葉病毒啟動子(標記為「CsVMV啟動子」)及SEQ ID NO:1之阿拉伯芥泛素C9 3'UTR(標記為「At Ubi9 3'UTR」)。該等調控元件係可以操作方式與*cry34Ab1*基因連接。於該質體上進一步包含*aad-1*基因表現盒，其包含玉米泛素1啟動子(標記為「Zm Ubi1啟動子」)及玉米脂酶3'UTR(標記為「Zm Lip 3'UTR」)。該等調控元件係可以操作方式與*aad-1*基因連接。

圖2：該圖為質體pDAB101556之示意圖，其包含玉米泛素1啟動子(標記為「Zm Ubi1啟動子」)及玉米過氧化物酶5' 3' UTR(標記為「Zm Per5 3'UTR」)。該等調控元件係可以操作方式與黃色螢光蛋白報導子基因(標記為「YFP」)連接。於該質體上進一步包含*aad-1*基因表現盒，其包含玉米泛素1啟動子(標記為「Zm Ubi1啟動子」)及玉米脂酶3' UTR(標記為「ZmLip3 3'UTR」)。該等調控元件係可以操作方式與*aad-1*基因連接。

### 【實施方式】

#### I. 若干實施例之綜述

轉殖基因植物產品之發展日益變得複雜。商業上可行的轉殖基因植物現需要堆疊多個轉殖基因至單個位點中。用於基礎研究或生物技術應用之植物啟動子及3' UTR一般而言係單向的，僅引導一個對於啟動子而言融合在其3'端(下游)或對於3' UTR而言融合在其5'端(上游)之基因。因此，各轉殖基因通常需要用於表現之啟動子及3' UTR，其中需要多個調控元件以於一個基因堆疊中表現多個轉殖基因。就增加基因堆疊中轉殖基因之數量而言，例行使用相同啟動子及/或3' UTR以獲得不同轉殖基因之表現圖譜之最佳水平。需要獲得轉殖基因表現之最佳水平以產生單個多基因特徵。不幸地，在本領域中已知經相同啟動子及/或3' UTR驅動之多基因構築體引起基因沉默，從而導致轉殖基因產物有效性較低。重複啟動子及/或3' UTR元件可導致基於同源之基因沉默。此外，轉殖基因中之重複序列可導致基因內座位同源重組，從而導致多核苷酸重排。轉殖基因之沉默及重排將極有可能對所產生轉殖基因植物表現轉殖基因之性能產生非所需的影響。另外，由於啟動子重複所致之轉錄因子(TF)-結合位點之過量可引起內源TF之缺失，從而導致轉錄滅活。假設需要引入多個基因至植物中以進行代謝工程化及特徵堆疊，則需要多種啟動子及/或3'

UTR以發展出驅動多個基因之表現之轉殖基因作物。

啟動子及/或3' UTR識別中之一特定問題為需要識別與特定細胞類型、發育階段及/或在該植物中之在其他植物組織中不表現之功能相關之組織特異性啟動子。組織特異性(亦即，組織較佳的)或器官特異性啟動子驅動某些組織中諸如植物之核、根、葉或絨氈層(tapetum)中之基因表現。組織及發育階段特異性啟動子及/或3' UTR可最初由觀察基因之表現來識別，該等基因係在特定組織中或在植物發育中的特定時間期表現。該等組織特異性啟動子及/或3' UTR係轉殖基因植物工業之某些應用所需求及因其允許以組織及/或發育階段選擇性方式特異性表現異種基因而所需，這表明異種基因差別性地在不同器官、組織及/或時間但非在其他組織中表現。例如，植物抗由土壤傳播病原體感染之抗性增加可藉由以抗病原體基因轉形植物基因組使得抗病原體蛋白質穩健地表現於植物的根中來達成。或者，可期望於處在特定生長或發育階段諸如例如細胞分裂或伸長之植物組織中表現轉殖基因。另一種應用為使用組織特異性啟動子及/或3' UTR以限制編碼農藝特徵之轉殖基因在特定組織類型例如發育中薄壁細胞中之表現之期望。因此，識別啟動子及/或3' UTR中之一特定問題為如何識別啟動子，及如何將所識別啟動子與用於特異性組織表現之細胞之發育性質相關聯。

關於識別啟動子之另一個問題為選殖所有相關順式活化及反式活化轉錄控制元件使得所選殖DNA片段以所想要特定表現圖譜驅動轉錄之需求。假設此等控制元件位於轉譯引發或開始位點遠端處，則經選擇包含啟動子之多核苷酸的大小對於提供啟動子多核苷酸序列之表現水平及表現圖譜具有重要性。已知啟動子長度包括功能性資訊，及已顯示不同基因具有較基因組中其他基因之啟動子長或短之啟動子。闡明啟動子之轉錄開始位點及預測啟動子區域中之功能性基因元件具

有挑戰性。進一步加大挑戰的是調節基元及順式-及反式-調控元件之複雜性、多樣性及固有退化性質(Blanchette, Mathieu等人「Genome-wide computational prediction of transcriptional regulatory modules reveals new insights into human gene expression.」Genome research 16.5 (2006):656-668)。該等順式-及反式-調控元件位於啟動子之調節基因之空間及時間表現以僅在所需位點及特定時間發生之遠端部分(Porto, Milena Silva等人「Plant promoters: an approach of structure and function.」Molecular biotechnology 56.1 (2014):38-49)。現有的啟動子分析工具無法可靠地識別基因組序列中之此等順式調控元件，因此預測過多的假陽性，此乃因該等工具一般僅集中於序列內容(Fickett JW, Hatzigeorgiou AG (1997) Eukaryotic promoter recognition. Genome research 7:861-878)。因此，啟動子調控元件之識別要求獲得特定尺寸之適宜序列，從而將導致驅動可以操作方式連接的轉殖基因以期望方式表現。

提供經由使用阿拉伯芥泛素C9調控元件以在原位表現轉殖基因來克服此等問題之方法及組合物。

## II. 術語及縮寫

在整篇申請案中，使用許多術語。為清楚且一致性地理解本說明書及申請專利範圍，包括此等術語所意欲給定之範疇，提供以下定義。

如本文所使用，術語「內含子」係指包含於經轉錄而未經轉譯之基因(或經表現之受關注多核苷酸序列)中之任何核酸序列。內含子包括DNA之經表現序列中之未經轉譯核酸序列以及由其轉錄之RNA分子中之對應序列。本文所述之構築體亦可包含提高轉譯及/或mRNA穩定性之序列，諸如內含子。此種內含子之一實例為阿拉伯芥組蛋白H3變體之基因II之第一內含子或任何其他常見內含子序列。內含子可

組合啟動子序列用於提高轉譯及/或mRNA穩定性。

術語「經分離」如本文所使用意指已自其自然環境移除，或自當先形成化合物時所存在的其他化合物移除。術語「經分離」包括自天然來源分離得的材料以及藉由在宿主細胞中重組表現製得後所回收的材料(例如，核酸及蛋白質)、或化學合成化合物諸如核酸分子、蛋白質及肽。

術語「經純化」如本文所使用係關於呈實質上不含通常與初始或天然環境中之分子或化合物相關聯之污染物、或相對於當先形成化合物時所存在的其他化合物實質上高濃度之形式之分子或化合物之分離，及意指由於與原始組合物之其他組分分離所致之純度之提高。術語「經純化之核酸」在本文中用於描述已與其他生物化合物(包括(但不限於)多肽、脂質及碳水化合物)分離，除其等外製得的，或經純化除去其等，同時實現組分中化學或功能性變化之核酸序列(例如，核酸可藉由移除蛋白質污染物及破壞連接核酸至染色體中之其餘DNA之化學鍵自染色體純化)。

術語「合成」如本文所使用係指經由如活體外製程之化學合成建立之多核苷酸(即，DNA或RNA)分子。例如，可於Eppendorf™管中在反應期間建立合成DNA，使得自DNA或RNA之初始股以酶法製得合成DNA。其他實驗室方法可用於合成多核苷酸序列。可於寡聚物合成儀上使用亞磷醯胺經由固相合成來以化學方式合成寡核苷酸。所合成的寡核苷酸可彼此經退火為複合物，由此產生「合成」多核苷酸。以化學方式合成多核苷酸之其他方法係此項技術中已知的，且可輕易地實施以用於本發明。

術語「約」如本文所使用意指比所述數值或數值範圍大或小10%，但無意僅指定任何數值或數值範圍於該較寬定義。前面加術語「約」之各數值或數值範圍亦意欲包含所述絕對數值或數值範圍之實

施例。

出於本發明之目的，「基因」包括編碼基因產物(參見以下)之DNA區以及所有調節基因產物之產生之DNA區，無論此等調節序列是否與編碼及/或轉錄序列相鄰。因此，基因包括但不一定限於啟動子序列、終止子、轉譯調節序列諸如核糖體結合位點及內部核糖體進入位點、增強子、沉默子、絕緣子、邊界元件、複製起點、基質附接位點及座位控制區。

如本文所使用，術語「初始」或「天然」定義在自然中發現之狀態。「初始DNA序列」為存於自然中之藉由天然手段或傳統的育種技術產生但非藉由遺傳工程化(例如，使用分子生物學/轉形技術)生成之DNA序列。

如本文所使用，「轉殖基因」定義為編碼基因產物之核酸序列，該基因產物包括(例如，但不限於)mRNA。在一個實施例中，該轉殖基因為外源核酸，其中轉殖基因序列已藉由遺傳工程化引入至通常未發現轉殖基因之宿主細胞(或其子代)中。在一個實例中，轉殖基因編碼工業上或醫藥上有用之化合物、或編碼期望的農業特徵之基因(例如，抗除草劑基因)。在又一實例中，轉殖基因為反義核酸序列，其中反義核酸序列之表現抑制靶核酸序列之表現。在一個實施例中，轉殖基因為內源核酸，其中期望該內源核酸之額外的基因組複本、或為宿主生物中相對靶核酸之序列成反義定向之核酸。

如本文所使用，術語「非阿拉伯芥泛素C9轉殖基因」或「非-AtUbiC9基因」為與玉米阿拉伯芥泛素C9基因編碼序列(SEQ ID NO:5，Genbank NCBI寄存編號AL035524.1)具有小於80%序列同一性之任何轉殖基因。

「基因產物」如本文所定義為藉由基因產生之任何產物。例如，基因產物可為基因之直接轉錄產物(例如，mRNA、tRNA、

rRNA、反義RNA、干擾RNA、核酶、結構性RNA或RNA之任何其他類型)或藉由轉譯mRNA產生之蛋白質。基因產物亦包括藉由製程諸如封端、聚腺苷酸化、甲基化及編輯改質之RNA及藉由例如甲基化、乙醯化、磷酸化、泛素化、ADP-核糖基化、肉豆蔻醯化及醯化改質之蛋白質。基因表現可受外部信號(例如，將細胞、組織或生物暴露於增加或減少基因表現之試劑)影響。基因之表現亦可在自DNA至RNA至蛋白質之路徑之任何處進行調節。基因表現之調節例如經由控制於轉錄、轉譯、RNA轉運及處理、中間分子諸如mRNA之降解之作用，或經由活化、失活、區室化或降解已製得後之特異性蛋白質分子、或藉由其組合發生。可由相關技術中已知的任何方法包括(但不限於)北方墨點、RT-PCR、西方墨點或活體外、原位或活體內蛋白質活性分析在RNA層級或蛋白質層級測量基因表現。

如本文所使用，術語「基因表現」係關於將核酸轉錄單元(包括，例如，基因組DNA)之經編碼之資訊轉化為細胞之操作、非操作或結構部分，通常包括蛋白質之合成所憑藉之製程。基因表現可受外部信號；例如，將細胞、組織或生物暴露於增加或減少基因表現之試劑影響。基因之表現亦可在自DNA至RNA至蛋白質之路徑之任何處進行調節。基因表現之調節例如經由控制於轉錄、轉譯、RNA輸送及處理、中間分子諸如mRNA之降解之作用，或經由活化、失活、區室化或降解已製得後之特異性蛋白質分子、或藉由其組合發生。可由相關技術中已知的任何方法包括(但不限於)北方墨點、RT-PCR、西方墨點或活體外、原位或活體內蛋白質活性分析在RNA層級或蛋白質層級測量基因表現。

如本文所使用，「基於同源之基因沉默」(HBGS)為包括轉錄基因沉默及轉錄後基因沉默兩者之通稱術語。藉由未連接沉默座位使靶座位沉默可能係由於轉錄抑制(轉錄基因沉默；TGS)或mRNA降解(轉錄

後基因沉默；PTGS)所致，因為產生分別對應於啟動子或經轉錄序列之雙股RNA(dsRNA)。各過程中不同細胞組分之涉及表明，dsRNA誘發TGS及PTGS極有可能係由於遠古共同機制之多樣化所致。然而，TGS與PTGS間之嚴格比較很難實現，因為其一般依賴於不同沉默座位之分析。在一些情況中，因為產生對應於不同靶基因之啟動子及經轉錄序列之dsRNA，一個轉殖基因座位可同時觸發TGS及PTGS。Mourrain等人(2007) *Planta* 225:365-79。極有可能地，siRNA為觸發同源序列上之TGS及PTGS之實際分子：siRNA將以該圖譜經由散佈轉殖基因序列之甲基化至內源啟動子中觸發順式及反式同源序列之沉默及甲基化。

如本文所使用，術語「核酸分子」(或「核酸」或「多核苷酸」)可指核苷酸之聚合形式，其可包括RNA、cDNA、基因組DNA之義股及反義股及上述之合成形式及混合聚合物兩者。核苷酸可指核糖核苷酸、脫氧核糖核苷酸或任一類型核苷酸之改質形式。「核酸分子」如本文所使用與「核酸」及「多核苷酸」同義。除非另作指明，否則核酸分子通常為至少10個鹼基長。該術語可指中間長度之RNA或DNA之分子。該術語包括DNA之單股及雙股形式。核酸分子可包括自然生成核苷酸及由自然生成及/或非自然生成之核苷酸鍵連接在一起之經改質核苷酸中之一者或兩者。

核酸分子可經化學或生化改質，或可包含非天然或衍生之核苷酸鹼基，如熟習此項技術者將可輕易瞭解。此等改質包括，例如，標籤、甲基化、由類似物取代一或多個自然生成之核苷酸、核苷酸間改質(例如，不帶電鍵合：例如，磷酸甲酯、磷酸三酯、亞磷醯胺、胺基甲酸酯等；帶電鍵合：例如，硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等；側基部分：例如，肽；嵌入劑：例如，吡啶、補骨脂素等；螯合劑；烷基化劑；及改質鍵合：例如， $\alpha$ 變旋異構核酸等)。術語「核酸分子」亦

包括任何拓撲構形，包括單股、雙股，特定言之雙螺旋、三螺旋、髮夾(hairpinned)、環形及掛鎖(padlocked)構形。

轉錄以5'至3'方式順著DNA股繼續進行。此意指RNA藉由連續新增核糖核苷酸-5'-三磷酸鹽至生長鏈之3'端(必要消除焦磷酸鹽)得到。在直鏈或環形核酸分子任一者中，離散元件(例如，特定核苷酸序列)若其等在從該元件起的5'方向結合或將結合至相同核酸則可稱為處於相對另一元件在「上游」或「5'」。類似地，離散元件若其等在該元件之3'方向結合或將結合至相同核酸則可處於相對另一元件在「下游」或「3'」。

鹼基「位置」如本文所使用係指給定鹼基或核苷酸殘基於指定核酸中之定位。該指定核酸可藉由與參考核酸比對定義(參見下文)。

雜交係指經由氫鍵使兩條多核苷酸股結合。寡核苷酸及其類似物藉由在互補鹼基之間氫鍵結，包括Watson-Crick、Hoogsteen或反向Hoogsteen氫鍵結雜交。一般而言，核酸分子由為嘧啶(胞嘧啶(C)、尿嘧啶(U)及胸腺嘧啶(T))或嘌呤(腺嘌呤(A)及鳥嘌呤(G))中任一者之含氮鹼基組成。此等含氮鹼基在嘧啶及嘌呤之間形成氫鍵，及嘧啶與嘌呤之結合稱為「鹼基配對」。更具體言之，A將氫鍵結至T或U，及G將鍵結至C。「互補」係指發生在兩個不同核酸序列或相同核酸序列之兩個不同區之間之鹼基配對。

「可特異性雜交」及「特異性互補」為指示足夠互補程度使得寡核苷酸及DNA或RNA標靶之間發生穩定及特異性結合之術語。寡核苷酸不一定係與其意欲特異性雜交之靶序列100%互補。當寡核苷酸與靶DNA或RNA分子結合干擾靶DNA或RNA之正常功能，且有足夠的互補程度避免在需要特異性結合之條件下，例如，就活體內分析或系統而言在生理條件下寡核苷酸與非標靶序列之非特異性結合時，寡核苷酸為可特異性雜交。此種結合稱為特異性雜交。

導致特定嚴苛度之雜交條件將根據所選雜交方法之性質及雜交核酸序列之組成及長度改變。一般而言，雜交溫度及雜交緩衝液之離子強度(尤其係 $\text{Na}^+$ 及/或 $\text{Mg}^{2+}$ 濃度)將造成雜交嚴苛度結果，然而，洗滌次數亦會影響嚴苛度。關於達成特定嚴苛程度所需之雜交條件之計算述於Sambrook等人(編)，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版，第1-3卷，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, 第9章及第11章中。

如本文所使用，「嚴苛條件」包括雜交將僅在雜交分子與DNA標靶之間失配小於50%情況下發生之條件。「嚴苛條件」包括其他特定的嚴苛水平。因此，如本文所使用，「中等嚴苛」條件為具有大於50%序列失配之分子將不雜交之其等條件；「高嚴苛」條件為具有大於20%失配之序列將不雜交之其等條件；及「極高嚴苛」條件為具有大於10%失配之序列將不雜交之其等條件。

在特定實施例中，嚴苛條件可包括在 $65^{\circ}\text{C}$ 下雜交，接著在 $65^{\circ}\text{C}$ 下用0.1x SSC/0.1% SDS洗滌40分鐘。

以下為代表性、非限制性雜交條件：

極高嚴苛度：在5x SSC緩衝液中於 $65^{\circ}\text{C}$ 下雜交16小時；在2x SSC緩衝液中於室溫下洗滌兩次，每次15分鐘；及在0.5x SSC緩衝液中於 $65^{\circ}\text{C}$ 下洗滌兩次，各20分鐘。

高嚴苛度：在5x至6x SSC緩衝液中於 $65$ 至 $70^{\circ}\text{C}$ 下雜交16至20小時；在2x SSC緩衝液中於室溫下洗滌兩次，每次5至20分鐘；及在1x SSC緩衝液中於 $55$ 至 $70^{\circ}\text{C}$ 下洗滌兩次各30分鐘。

中等嚴苛度：在6x SSC緩衝液中於室溫至 $55^{\circ}\text{C}$ 下雜交16至20小時；在2x至3x SSC緩衝液中於室溫至 $55^{\circ}\text{C}$ 下洗滌兩次各20至30分鐘。

在特定實施例中，可特異性雜交之核酸分子可在極高嚴苛雜交

條件下保持結合。在該等及其他實施例中，可特異性雜交之核酸分子可在高嚴苛雜交條件下保持結合。在該等及其他實施例中，可特異性雜交之核酸分子可在中等嚴苛雜交條件下保持結合。

寡核苷酸：寡核苷酸為短核酸聚合物。寡核苷酸可藉由較長核酸片段裂解，或藉由聚合個別核苷酸前驅物形成。自動合成儀允許合成寡核苷酸長達幾百個鹼基對長。因為寡核苷酸可結合至互補核苷酸序列，故其可用作用於偵測DNA或RNA之探針。由DNA組成之寡核苷酸(寡脫氧核糖核苷酸)可用於PCR中，一種擴增小DNA序列之技術。在PCR中，寡核苷酸通常稱為「引物」，其允許DNA聚合酶將寡核苷酸延伸並複製互補股。

如本文所使用，術語「序列同一性」或「同一性」如本文在兩個核酸或多肽序列之情況中所使用可指兩個序列中之在指定比較窗中比對最大一致性時為相同的殘基。

如本文所使用，術語「序列同一性百分比」可指藉由於比較窗中比較兩個最佳比對序列(例如，核酸序列及胺基酸序列)確定的值，其中該序列之在比較窗中之部分可包括相較參考序列(其不包括新增或缺失)而言之新增或缺失(即，空位)以最佳比對這兩個序列。該百分率係藉由以下計算得：測定兩個序列中出現相同核苷酸或胺基酸殘基之位置的數量以得到匹配位置的數量，將相匹配位置的數量除以比較窗中位置的總數，及結果乘以100以得到序列同一性百分比。

相關技術中熟知出於比較而比對序列之方法。各種程式及比對演算法描述於例如以下中：Smith及Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482；Needleman及Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443；Pearson及Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444；Higgins及Sharp (1988) *Gene* 73:237-44；Higgins及Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-3；Corpet等人(1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90；Huang等人(1992)

*Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65 ; Pearson等人(1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-31 ; Tatiana等人(1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50。序列比對方法及同一性計算之詳細考量可在例如 Altschul等人(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10中發現。

美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information)(NCBI)基本局部比對搜索工具(BLAST™ ; Altschul等人(1990))係得自若干來源，包括美國國家生物技術資訊中心(Bethesda, MD)，及互聯網上，以與若干序列分析程式搭配使用。可在互聯網上於BLAST™之「幫助」部分下方獲得如何使用該程式測定序列同一性之說明。為比較核酸序列，BLAST™(Blastn)程式之「Blast 2序列」功能可使用預設參數利用。與參考序列具有甚至更大相似性的核酸序列將顯示當藉由該方法評估時同一性百分率增加。

如本文所使用，術語「可以操作方式連接」係關於第一核酸序列當在該第一核酸序列與第二核酸序列處於功能關係時可以操作方式與該第二核酸序列連接。例如，啟動子當在該啟動子影響編碼序列之轉錄或表現時可以操作方式與該編碼序列連接。當以重組方式產生時，可以操作方式連接之核酸序列一般鄰接，及若需要則在相同閱讀框中將兩個蛋白質編碼區接合。然而，元件不需要鄰接來以可操作方式連接。

如本文所使用，術語「啟動子」係指DNA之一般位於基因上游(朝向基因之5'區)及需要其以引發並驅動基因之轉錄之區。啟動子可允許其控制的基因之恰當活化或抑制。啟動子可包含由轉錄因子識別之特異性序列。該等因子可結合至啟動子DNA序列，此導致RNA聚合酶(自基因之編碼區合成RNA之酶)募集。啟動子一般係指位於基因上游之所有基因調控元件，包括上游啟動子、5' UTR、內含子及前導序列。

如本文所使用，術語「上游啟動子」係指足以導引引發轉錄之鄰接多核苷酸序列。如本文所使用，上游啟動子包括藉由若干序列基元(包括TATA Box、引發序列、TFIIB識別元件及其他啟動子基元)引發轉錄之位點(Jennifer, E.F.等人，(2002) *Genes & Dev.*, 16:2583-2592)。上游啟動子提供作用於RNA聚合酶II之位點，該RNA聚合酶II為具有基礎或一般轉錄因子例如TFIIA、B、D、E、F及H之多亞單位酶。該等因子可組裝成催化RNA自DNA模板合成之轉錄預引發複合物。

上游啟動子之活化係藉由以下完成：各式蛋白質結合至DNA序列元件之額外序列並於隨後與轉錄引發複合物相互作用以活化基因表現。該等基因調控元件序列與特異性DNA結合因子相互作用。該等序列基元有時稱為順式-元件。組織特異性或發育特異性轉錄因子所結合的此等順式元件可單獨地或以組合方式在轉錄層級決定啟動子之時空表現形式。該等順式元件在其對可以操作方式連接之基因發揮的控制類型具有廣泛地變化。一些元件可回應環境反應(例如，溫度、水分及傷口)而增加可以操作方式連接之基因的轉錄作用。其他順式元件會針對發育線索(例如，發芽、種子成熟及開花)或空間資訊(例如，組織特異性)做出回應。參見，例如，Langridge等人，(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3219-23。該等順式元件位於距轉錄開始點不同的距離處，一些順式元件(稱為近端元件)係與最小核心啟動子區相鄰，而其他元件可定位在啟動子之數千鹼基上游或下游(增強子)。

如本文所使用，術語「5'未轉譯區」或「5'UTR」定義為前-mRNA或成熟mRNA之5'端中的未轉譯片段。例如，於成熟mRNA上，5'UTR通常位於其5'端7-甲基鳥苷封端上且參與許多過程，諸如剪接、聚腺苷酸化、mRNA向細胞質輸出、藉由轉譯機械識別mRNA的5'端及保護mRNA免於降解。

如本文所使用，術語「轉錄終止子」定義為前-mRNA或成熟mRNAs之3'端中的經轉錄片段。例如，超出「聚腺苷酸化信號」位點之DNA之較長延伸係經轉錄為前-mRNA。該DNA序列通常包含用於恰當處理前-mRNA成為成熟mRNA之轉錄終止信號。

如本文所使用，術語「3'未轉譯區」或「3' UTR」定義為前-mRNA或成熟mRNA之3'端中的未轉譯片段。例如，於成熟mRNA上，該區具有聚-(A)尾及已知在mRNA穩定性、轉譯引發及mRNA輸出中具有諸多作用。此外，3' UTR被認為包括聚腺苷酸化信號及轉錄終止子。

如本文所使用，術語「聚腺苷酸化信號」指示存於mRNA轉錄本中之當存在聚-(A)聚合酶下允許轉錄本於例如位於聚-(A)信號下游10至30個鹼基之聚腺苷酸化位點上聚腺苷酸化之核酸序列。許多聚腺苷酸化信號係相關技術中已知及可用於本發明。一例示性序列包括AAUAAA及其變體，如Loke J.等人，(2005) *Plant Physiology* 138(3)；1457-1468中所述。

「DNA結合轉殖基因」為編碼DNA結合蛋白質之多核苷酸編碼序列。DNA結合蛋白質隨後能與另一分子結合。結合蛋白質可結合至例如DNA分子(DNA結合蛋白質)、RNA分子(RNA結合蛋白質)及/或蛋白質分子(蛋白質結合蛋白質)。就蛋白質結合蛋白質而言，其可與自身結合(以形成同質二聚體、同質三聚體等)且/或其可與不同蛋白質之一或多個分子結合。結合蛋白質可具有超過一種類型之結合活性。例如，鋅指蛋白具有DNA-結合活性、RNA結合活性及蛋白質結合活性。

DNA結合蛋白質之實例包括；大範圍核酸酶(meganuclease)、鋅指、CRISPR、及TALE結合域，其等可「經工程化」以結合至預定核苷酸序列。通常，該經工程化DNA結合蛋白質(例如，鋅指、CRISPR

或TALE)為非自然生成之蛋白質。用於工程化DNA結合蛋白質之方法之非限制性實例為設計及選擇。經設計之DNA結合蛋白質為非自然中生成之蛋白質，其之設計/組成主要源自於理性標準。設計之理性標準包括應用取代規則及用於處理現有的ZFP、CRISPR及/或TALE設計及結合資料之資料庫儲存資訊中之資訊之電腦化演算法。參見，例如，美國專利6,140,081；6,453,242；及6,534,261；亦可參見WO 98/53058；WO 98/53059；WO 98/53060；WO 02/016536及WO 03/016496及美國公開案第20110301073號、第20110239315號及第20119145940號。

「鋅指DNA結合蛋白質」(或結合域)為蛋白質、或較大蛋白質中之域，其以序列特異性方式經由一或多個鋅指與DNA結合，該等鋅指為胺基酸序列在結合域中之區，其之結構經由鋅離子配位穩定。術語鋅指DNA結合蛋白質通常簡寫為鋅指蛋白質或ZFP。鋅指結合域可「經工程化」以結合至預定核苷酸序列。用於工程化鋅指蛋白質之方法之非限制性實例為設計及選擇。經設計之鋅指蛋白質為非自然中生成之蛋白質，其之設計/組成主要源自於理性標準。設計之理性標準包括應用取代規則及用於處理現有的ZFP設計及結合資料之資料庫儲存資訊中之資訊之電腦化演算法。參見，例如，美國專利第6,140,081號；第6,453,242號；第6,534,261號及第6,794,136號；亦可參見WO 98/53058；WO 98/53059；WO 98/53060；WO 02/016536及WO 03/016496。

在其他實例中，核酸酶之一者或多者之DNA結合域包括自然生成或工程化(非自然生成)之TAL效應子DNA結合域。參見，例如，美國專利公開案第20110301073號，其以其全文引用的方式併入本文。已知植物黃單孢菌(*Xanthomonas*)屬致病細菌可引起重要農作物中許多疾病。黃單孢菌之致病性取決於注射多種不同的效應子蛋白質至植

物細胞中之保守III型分泌(T3S)系統。在該等所注射之蛋白質當中有模擬植物轉錄活化劑並操縱植物轉錄體之類轉錄活化劑(TALEN)效應子(參見Kay等人, (2007) *Science* 318:648-651)。該等蛋白質包含DNA結合域及轉錄活化域。一種最為明確表徵之TAL-效應子為源自於野油菜黃單孢菌葉斑病(*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*)之AvrBs3(參見Bonas等人, (1989) *Mol Gen Genet* 218:127-136及WO2010079430)。TAL-效應子包含串聯重複之中央域, 各重複包含約34個胺基酸, 該等胺基酸係該等蛋白質之DNA結合特異性的關鍵。此外, 其包含核定位序列及酸性轉錄活化域(評審參見Schornack S等人, (2006) *J Plant Physiol* 163(3):256-272)。此外, 在植物病原性細菌青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)中, 已發現兩個基因(指定為brg11及hpx17)與青枯病菌生物變型菌株GMI1000中及生物變型4菌株RS1000中單黃孢菌之AvrBs3家族同源(參見Heuer等人, (2007) *Appl and Enviro Micro* 73(13):4379-4384)。該等基因之核苷酸序列彼此間為98.9%相同然不同之處在於hpx17之重複域中缺失1,575個bp。然而, 兩種基因產物與黃單孢菌之AvrBs3家族蛋白質具有小於40%序列同一性。參見, 例如, 美國專利公開案第20110301073號, 該案以其全文引用的方式併入。

該等TAL效應子之特異性取決於在串聯重複中發現之序列。該重複序列包含約102個bp及該等重複通常彼此間為91至100%同源(Bonas等人, 同上)。該等重複之多態現象通常位於位置12及13及位置12及13之超變雙殘基之同一性與TAL效應子靶序列中鄰接核苷酸之同一性之間看起來存在一對一的對應性(參見Moscou及Bogdanove, (2009) *Science* 326:1501及Boch等人, (2009) *Science* 326:1509-1512)。實驗上, 已判定該等TAL效應子之用於DNA識別之天然密碼使得在位置12及13之HD序列造成與胞嘧啶(C)結合, NG與T結合, NI與A、C、G或

T結合，NN與A或G結合，及ING與T結合。該等DNA結合重複已藉由重複之新組合及數量組裝至蛋白質中，以製得能夠與新序列相互作用並活化植物細胞中非內源報導子基因之表現之人工轉錄因子(Boch等人，同上)。工程化TAL蛋白質已連接至*FokI*裂解半域以產生展現在酵母報導子分析(基於質體之標靶)中活性之TAL效應子域核酸酶融合(TALEN)。

CRISPR(成簇的規律間隔的短迴文結構重複)/Cas(與CRISPR相關聯)核酸酶系統為基於可用於基因組工程化之細菌系統之最新工程化之核酸酶系統。其係基於許多細菌及古生菌之適應性免疫反應的一部分。當病毒或質體侵入細菌時，侵入者DNA之片段藉由「免疫」反應轉化為CRISPR RNA(crRNA)。該crRNA接著經由部分互補區與另一類型之稱為tracrRNA的RNA締合以導引Cas9核酸酶至與稱為「原型間隔子」的靶DNA中之crRNA同源之區。Cas9裂解DNA以在雙股斷裂(DSB)時於由包含於crRNA轉錄本中之20-核苷酸導引序列指定之位點處產生鈍端。Cas9需要crRNA及tracrRNA二者以用於位點特異性DNA識別及裂解。該系統現已經過工程化使得crRNA及tracrRNA可組成一個分子(「單導引RNA」)，及單導引RNA之crRNA等效部分可經工程化以導引Cas9核酸酶來靶向任何所需序列(參見Jinek等人，(2012) *Science* 337, 第816-821頁；Jinek等人，(2013), *eLife* 2:e00471及David Segal, (2013) *eLife* 2:e00563)。因此，CRISPR/Cas系統可經工程化以在基因組之所需標靶處建立DSB，及DSB之修復可能會受使用修復抑制劑影響而引起錯誤傾向修復增加。

在其他實例中，DNA結合轉殖基因為包括經工程化(非自然生成之)大範圍核酸酶(亦描述作歸巢核酸內切酶)之位點特異性核酸酶。已知歸巢核酸內切酶或大範圍核酸酶之識別序列，諸如I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、

I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII及I-TevIII。亦參見美國專利第5,420,032號；美國專利第6,833,252號；Belfort等人，(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-30 3388；Dujon等人，(1989) *Gene* 82:115-118；Perler等人，(1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 11127；Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228；Gimble等人，(1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180；Argast等人，(1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353及新英格蘭生物學實驗室目錄(New England Biolabs catalogue)。此外，歸巢核酸內切酶及大範圍核酸酶之DNA結合特異性可經工程化以結合非天然靶位點。參見，例如，Chevalier等人，(2002) *Molec. Cell* 10:895-905；Epinat等人，(2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962；Ashworth等人，(2006) *Nature* 441:656-659；Paques等人，(2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66；美國專利公開案第20070117128號。歸巢核酸內切酶及大範圍核酸酶之DNA結合域可在核酸酶之情況中作為整體而改變(亦即，使得核酸酶包括同源裂解域)或可融合至異源裂解域。

如本文所使用，術語「轉形」包括所有可將核酸分子引入至此種細胞中之技術。實例包括(但不限於)：藉由病毒載體轉染；藉由質體載體轉形；電穿孔；脂質轉染；微量注射(Mueller等人，(1978) *Cell* 15:579-85)；黃單孢菌介導之轉移；直接DNA吸收；WHISKERS™介導之轉形；及微彈轟擊。該等技術可用於植物細胞之穩定轉形及短暫轉形。「穩定轉形」係指引入核酸片段至宿主生物體之基因組中，從而導致基因穩定遺傳。一旦穩定地轉形，核酸片段穩定地整合於宿主生物體及任何後代之基因組中。包含經轉形核酸片段之宿主生物體稱為「轉殖基因」生物體。「短暫轉形」係指引入核酸片段至宿主生物體之細胞核或含DNA細胞器中，從而導致基因表現而不會基因穩定遺傳。

本發明係關於一種外源核酸序列。在一個實例中，轉殖基因為

基因序列(例如，抗除草劑基因)、編碼工業上或醫藥上有用之化合物之基因或編碼期望之農業特徵之基因。在又一實例中，轉殖基因為反義核酸序列，其中反義核酸序列之表現抑制靶核酸序列之表現。轉殖基因可包含可以操作方式連接至轉殖基因(例如，啟動子)之調節序列。在一些實施例中，受關注多核苷酸序列為轉殖基因。然而，在其他實施例中，受關注多核苷酸序列為內源核酸序列，其中期望該內源核酸序列之額外的基因組複本，或為相對宿主生物體中之靶核酸分子之序列為反義定向之核酸序列。

如本文所使用，術語轉殖基因「品系」係藉由以異源DNA(即包括受關注轉殖基因之核酸構築體)轉形植物細胞，由插入轉殖基因至植物之基因組中所致之再生植物群體，及篩選藉由插入至特定基因組位置中表徵之特定植物而產生。術語「品系」係指原型轉形體及轉形體之包括異源DNA之子代。術語「品系」亦指藉由轉形體與另一包括基因組/轉殖基因DNA之變體間性異交產生之子代。即使在重複回交至輪回親本後，來自經轉形親本之所插入的轉殖基因DNA及側接基因組DNA(基因組/轉殖基因DNA)存於雜交子代中的相同染色體位置。術語「品系」亦指原型轉形體及其子代之DNA，其包含所插入DNA及與所插入DNA緊密相鄰的側接基因組序列，該所插入DNA將預期轉移至一子代，該子代由一個包括所插入DNA之親本系(例如，由自交產生之原型轉形體及子代)與不包含所插入DNA的親本系性交所致接受包括受關注轉殖基因之所插入DNA。

如本文所使用，術語「聚合酶鏈反應」或「PCR」定義一種程序或技術，其中如1987年7月28日發證之美國專利第4,683,195號中所述擴增最少量之核酸、RNA及/或DNA。一般而言，來自受關注或不受關注的區末端之序列資訊必需可用，使得可設計寡核苷酸引物；該等引物在序列上將與意欲擴增之模板之相反股相同或相似。兩個引物之

5'端核苷酸可與經擴增材料之末端重合。PCR可用於擴增特異性RNA序列、來自總基因組DNA之特異性DNA序列、及自總細胞RNA、噬菌體或質體序列轉錄之cDNA等。一般參見Mullis等人, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263 (1987); Erlich編, *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989)。

如本文所使用, 術語「引物」係指當在適用於合成引物延伸產物之條件時能夠充作引發沿著互補股合成的點之寡核苷酸。合成條件包括存在四種不同脫氧核糖核苷酸三磷酸鹽及至少一種聚合引發劑諸如逆轉錄酶或DNA聚合酶。此等係存於適宜緩衝液中, 該適宜緩衝液可包含為共因子或在各種適宜溫度下影響條件諸如pH及類似之組分。引物較佳為單股序列, 使得最佳化擴增效率, 但亦可利用雙股序列。

如本文所使用, 術語「探針」係指雜交至靶序列之寡核苷酸。在TaqMan<sup>®</sup>或TaqMan<sup>®</sup>型分析程序中, 探針雜交至標靶之位於兩個引物之退火位點之間之一部分。探針包含約八個核苷酸、約十個核苷酸、約十五個核苷酸、約二十個核苷酸、約三十個核苷酸、約四十個核苷酸或約五十個核苷酸。在一些實施例中, 探針包含約八個核苷酸至約十五個核苷酸。探針可進一步包含可偵測之標籤, 例如, 螢光團(Texas-Red<sup>®</sup>、異硫氰酸螢光素等)。可偵測之標籤可直接共價附接至探針寡核苷酸, 例如, 位於探針的5'端或探針的3'端。包含螢光團之探針亦可進一步包含淬滅劑, 例如, Black Hole Quencher<sup>™</sup>、Iowa Black<sup>™</sup>等。

如本文所使用, 術語「限制核酸內切酶」及「限制酵素」係指細菌酵素, 其各在特異性核苷酸序列處或接近處切割雙股DNA。2型限制酵素識別並在相同位點裂解DNA, 及包括(但不限於)XbaI、BamHI、HindIII、EcoRI、XhoI、Sall、KpnI、AvaI、PstI及SmaI。

如本文所使用，術語「載體」可與術語「構築體」、「選殖載體」及「表現載體」互換使用及意指DNA或RNA序列(例如，外來基因)可藉其引入至宿主細胞中，以便轉形宿主並促進所引入的序列表現(例如轉錄及轉譯)之媒介。「非病毒載體」意指不包含病毒或逆轉錄病毒之任何載體。在一些實施例中，「載體」為DNA之包含至少一個DNA複製起點及至少一個可選擇標誌基因之序列。實例包括(但不限於)質體、黏質體、噬菌體、細菌人工染色體(BAC)或攜載外源DNA至細胞中之病毒。載體亦可包含一或多個基因、反義分子、及/或可選擇標誌基因及相關技術中已知的其他遺傳元件。載體可轉導、轉形或感染細胞，藉此引起細胞表現核酸分子及/或由載體編碼之蛋白質。術語「質體」定義核酸之能夠在原核或真核宿主細胞中常染色體複製之環形鏈。該術語包括可為DNA或RNA中任一者之核酸及可為單股或雙股。該定義之質體亦可包含對應於細菌複製起點之序列。

如本文所使用，術語「可選擇標誌基因」如本文所使用定義編碼有利於識別其中插入可選擇標誌基因的細胞之蛋白質之基因或其他表現盒。例如，「可選擇標誌基因」包涵報導子基因以及用於植物轉形中以例如保護植物細胞不受選擇性試劑影響或提供選擇性試劑抗性/耐受性之基因。在一個實施例中，僅彼等接受功能性可選擇標誌之細胞或植物能夠於具有選擇性試劑之條件下分裂或生長。選擇性試劑之實例可包括(例如)抗生素，包括壯觀黴素(spectinomycin)、新黴素(neomycin)、康黴素(kanamycin)、巴龍黴素(paromomycin)、健大黴素(gentamicin)及潮黴素(hygromycin)。該等可選擇標誌包括新黴素磷酸轉移酶(npt II)，其表現賦予抗生素康黴素抗性之酵素、及針對相關抗生素新黴素、巴龍黴素、健大黴素及G418之基因、或針對潮黴素磷酸轉移酶(hpt)之基因，其表現賦予潮黴素抗性之酵素。其他可選擇標誌基因可包括編碼除草劑抗性之基因，其包括bar或pat(對草銨膦

(glufosinate ammonium)或草丁膦(phosphinothricin)之抗性)、乙醯乳酸鹽合成酶(ALS, 對防止合成分支鏈胺基酸中之第一步驟之抑制劑諸如磺醯脲(SU)、咪唑啉酮(IMI)、三唑并嘧啶(TP)、嘧啶基氧基苯甲酸酯(POB)及磺醯胺基羰基三唑啉酮之抗性)、嘉磷塞(glyphosate)、2,4-D及金屬抗性或敏感性。可用為可選擇標誌基因之「報導子基因」之實例包括目測觀察經表現之報導子基因蛋白質, 諸如, 編碼 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(GUS)、螢光素酶、綠色螢光蛋白質(GFP)、黃色螢光蛋白質(YFP)、DsRed、 $\beta$ -半乳糖苷酶、氯黴素乙醯基轉移酶(CAT)、鹼性磷酸酶及類似之蛋白質。詞語「標誌陽性」係指已經過轉形以包含可選擇標誌基因之植物。

如本文所使用, 術語「可偵測標誌」係指能夠偵測之標籤, 諸如, 例如放射性同位素、螢光化合物、生物發光化合物、化學發光化合物、金屬螯合劑或酵素。可偵測標誌之實例包括(但不限於)下列: 螢光標籤(例如, FITC、若丹明(rhodamine)、鐳系磷光體)、酵素標籤(例如, 辣根過氧化物酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、螢光素酶、鹼性磷酸酶)、化學發光、生物素基、由二級報導子識別之預定多肽抗原決定基(例如, 白胺酸拉鍊對序列、二級抗體之結合位點、金屬結合域、抗原決定基標籤)。在一個實施例中, 可偵測標誌可由不同長度之間隔臂附接以減小潛在的空間位阻。

如本文所使用, 術語「盒」、「表現盒」及「基因表現盒」係指DNA之可在特定限制位點或藉由同源重組插入至核酸或多核苷酸中之片段。如本文所使用, DNA之片段包括編碼受關注多肽之多核苷酸, 及該盒及限制位點係經設計以確保該盒插入恰當的閱讀框中以用於轉錄或轉譯。在一個實施例中, 表現盒可包括編碼受關注多肽且具有除了多核苷酸外的有利於轉形特定宿主細胞之元件之多核苷酸。在一個實施例中, 基因表現盒亦可包括允許增強表現在宿主細胞中編碼受關

注多肽之多核苷酸之元件。該等元件可包括(但不限於)：啟動子、最小啟動子、增強子、響應元件、終止子序列、聚腺苷酸化序列及類似。

如本文所使用，「連接子」或「間隔子」為將兩個不同實體彼此結合之鍵、分子或分子群組。連接子及間隔子可提供兩個實體之最佳間隔或可進一步提供允許這兩個實體彼此分開之不穩定鍵。不穩定鍵包括光可裂解基團、酸不穩定部分、鹼不穩定部分及酵素可裂解基團。術語「多連接子」或「多選殖位點」如本文所使用定義位於核酸序列上彼此10個核苷酸中之三個或更多個2型限制酶位點叢。在其他實例中，術語「多連接子」如本文所使用係指靶向經由任何已知無縫選殖法(即，Gibson Assembly®、NEBuilder HiFiDNA Assembly®、Golden Gate Assembly、BioBrick®組裝等)接合兩個序列之核苷酸延伸。包含多連接子之構築體係用於插入及/或切除核酸序列諸如基因之編碼區。

如本文所使用，術語「對照」係指出於比較目的用於分析程序中之樣本。對照可係「陽性」或「陰性」。例如，在分析程序之目的係偵測細胞或組織中經差異性表現之轉錄本或多肽之情況下，一般較佳包括陽性對照，諸如自展現期望表現之已知植物之樣本、及陰性對照，諸如缺乏期望表現之已知植物之樣本。

如本文所使用，術語「植物」包括整株植物及植物之任何後代、細胞、組織或部分。可用於本發明中之植物之類別一般而言範圍寬泛如適合突變之高級及低級植物之類別，包括被子植物(單子葉及雙子葉植物)、裸子植物、蕨類及多細胞藻類。因此，「植物」包括雙子葉植物及單子葉植物。術語「植物部分」包括植物之任何部分，包括(例如，但不限於)：種子(包括成熟種子及未成熟種子)；植物扞枝；植物細胞；植物細胞培養物；植物器官(例如，花粉、胚胎、

花、果實、嫩枝、葉、根、莖及外植體)。植物組織或植物器官可為種子、原生質體、癒傷組織或任何其他經組構為結構性或功能性單元之植物細胞組。植物細胞或組織培養物可具有再生具有獲得該細胞或組織之植物之生理及形態特徵之植物及再生具有實質上與該植物相同之基因型之植物的能力。相比之下，一些植物細胞不能夠再生來產生植物。植物細胞或組織培養物中之可再生細胞可為胚胎、原生質體、分生組織細胞、癒傷組織、花粉、葉、花藥、根、根尖、鬚、花、仁、穗、棒、殼或稈。

植物部分包括可收穫部分及可用於繁殖子代植物之部分。可用於繁殖之植物部分包括(例如但不限於)：種子；果實；扞枝；幼苗；塊莖；及根莖。植物之可收穫部分可為植物之任何有用部分，包括(例如但不限於)：花；花粉；幼苗；塊莖；葉；莖；果實；種子；及根。

植物細胞為植物之結構性及生理性單元，包括原生質體及細胞壁。植物細胞可呈經分離之單細胞、或細胞聚集物(例如，鬆散型癒傷組織及經培養之細胞)之形式，及可為高組織單元(例如，植物組織、植物器官及植物)之部分。因此，植物細胞可為原生質體、產生配子之細胞或可再生成為整株植物之細胞或細胞集合。因此，包含多個植物細胞且能夠再生成為整株植物之種子在本文實施例中被視為「植物細胞」。

如本文所使用，術語「小RNA」係指若干種類別之非編碼核糖核酸(ncRNA)。術語小RNA描述產生於細菌細胞、動物、植物及真菌中之ncRNA的短鏈。該等ncRNA之短鏈可自然地產生於細胞中或可藉由引入表現短鏈或ncRNA之外源序列而產生。小RNA序列不直接編碼蛋白質，及在功能上不同於其他RNA，因為小RNA序列僅轉錄而未轉譯。小RNA序列參與其他細胞功能，包括基因表現及修飾。小RNA分

子通常由約20至30個核苷酸組成。小RNA序列可衍生自較長的前驅物。該等前驅物形成在自互補區中彼此向後折疊之結構；其接著藉由動物中核酸酶Dicer或植物中DCL1進行處理。

許多類型之小RNA係天然存在的或人工製得，包括微型核糖核酸(miRNA)、短干擾RNAs(siRNA)、反義RNA、短髮夾RNA(shRNA)及小核仁RNA(snoRNA)。特定類型之小RNA諸如微型核糖核酸及siRNA在基因沉默及RNA干擾(RNAi)中具重要意義。基因沉默係將通常表現的基因藉由細胞內元件(在此情況中，小RNA)「關閉」之遺傳調節過程。因干擾而不形成通常將藉由該遺傳資訊形成之蛋白質，及阻擋在該等基因中編碼之資訊表現。

如本文所使用，術語「小RNA」包涵在文獻中描述作為以下之RNA分子：「微RNA」(Storz, (2002) *Science* 296:1260-3；Illangasekare等人，(1999) *RNA* 5:1482-1489)；原核「小RNA」(sRNA)(Wassarman等人，(1999) *Trends Microbiol.* 7:37-45)；真核「非編碼RNA(ncRNA)」；「微型核糖核酸(miRNA)」；「小非-mRNA(snmRNA)」；「功能性RNA(frRNA)」；「轉移RNA(tRNA)」；「催化RNA」[例如，核酶，包括自醃化核酶(Illangasekare等人，(1999) *RNA* 5:1482-1489)；「小核仁RNA(snoRNA)」，「tmRNA」(又稱「10S RNA」，Muto等人，(1998) *Trends Biochem Sci.* 23:25-29；及Gillet等人，(2001) *Mol Microbiol.* 42:879-885)；RNAi分子，其包括(但不限於)「小干擾RNA(siRNA)」，「經內切核糖核酸酶製得之siRNA(e-siRNA)」，「短髮夾RNA(shRNA)」，及「經短暫調節之小RNA(stRNA)」，「經切割之siRNA(d-siRNA)」，及適合體、寡核苷酸及包含至少一個尿嘧啶鹼基之其他合成核酸。

除非另作具體說明，否則本文所使用的所有技術及科學術語具有與熟習本發明所屬之技術者通常所瞭解相同的含義。分子生物學常

用術語之定義可參見，例如：Lewin, *Genes V*, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9)；Kendrew 等人 (編), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)；及 Meyers (編), *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。

如本文所使用，除非本文清楚且明確地另作指明，否則冠詞「一」、「一個」及「該」包括複數個指示物。

### III. 阿拉伯芥泛素C9基因調控元件及包含其之核酸

提供使用啟動子或源自阿拉伯芥泛素C9基因之3' UTR以在植物中表現非阿拉伯芥泛素C9樣轉殖基因之方法及組合物。在一個實施例中，3' UTR可為SEQ ID NO:1之阿拉伯芥泛素C9基因3' UTR。

轉殖基因表現可藉由位於基因編碼序列下游之3'未轉譯基因區(即3' UTR)調節。啟動子及3' UTR皆可調節轉殖基因表現。在必需啟動子來驅動轉錄時，3' UTR基因區可終止轉錄並引發所得mRNA轉錄本之聚腺苷酸化以進行轉譯及蛋白質合成。3' UTR基因組有助於轉殖基因之穩定表現。在一個實施例中，基因表現盒包含3' UTR。在一個實施例中，3' UTR可為阿拉伯芥泛素C9基因3' UTR。在一個實施例中，基因表現盒包含3' UTR，其中該3' UTR與SEQ ID NO:1至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%或100%相同。在一個實施例中，基因表現盒包含可以操作方式與轉殖基因連接之阿拉伯芥泛素C9基因3' UTR。在一個例示性實施例中，基因表現盒包含可以操作方式與轉殖基因連接之3' UTR，其中該轉殖基因可為抗殺昆蟲劑轉殖基因、除草劑耐受性轉殖基因、氮利用效率轉殖基因、水利用效率轉殖基因、營養品質轉殖基因、DNA結合轉殖基因、可選擇標誌轉殖基因或其組

合。

在一個實施例中，基因表現盒包含源自阿拉伯芥泛素C9基因之3' UTR及啟動子，其中該啟動子與SEQ ID NO:2至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%或100%相同。在一個實施例中，基因表現盒包含源自阿拉伯芥泛素C9基因之3' UTR及啟動子，其中該啟動子係源自阿拉伯芥泛素C9基因。在一個實施例中，基因表現盒包含源自阿拉伯芥泛素C9基因之3' UTR及啟動子，其中該啟動子係源自植物(例如，玉米葉綠素a/b結合基因啟動子或玉米泛素1啟動子)、病毒(例如，木薯葉脈花葉病毒啟動子)或細菌(例如，農桿菌，delta mas)。在一個例示性實施例中，基因表現盒包含可以操作方式與轉殖基因連接之阿拉伯芥泛素C9基因，其中該轉殖基因可為抗殺昆蟲劑轉殖基因、除草劑耐受性轉殖基因、氮利用效率轉殖基因、水利用效率轉殖基因、營養品質轉殖基因、DNA結合轉殖基因、可選擇標誌轉殖基因或其組合。

在一個實施例中，核酸載體包含如本文所揭示之基因表現盒。在一個實施例中，載體可為質體、黏質體、細菌人工染色體(BAC)、噬菌體、病毒、或用於直接轉換或基因靶向諸如供體DNA之離體多核苷酸片段。

根據一個實施例，提供包含重組基因表現盒之核酸載體，其中該重組基因表現盒包含可以操作方式與多連接子序列連接之阿拉伯芥泛素C9 3'UTR、非阿拉伯芥泛素C9基因或其組合。在一個實施例中，該重組基因盒包含可以操作方式與非阿拉伯芥泛素C9基因連接之阿拉伯芥泛素C9 3'UTR。在一個實施例中，該重組基因盒包含如本文所揭示之可以操作方式與多連接子序列連接之阿拉伯芥泛素C9 3'UTR。該多連接子可以操作方式與阿拉伯芥泛素C9 3'UTR連接，連接方式使得插入編碼序列至該多連接子之一個限制位點中將可以操作

方式連接編碼序列，從而允許該編碼序列在當載體經轉形或轉染至宿主細胞中時表現。

根據一個實施例，提供包含基因盒之核酸載體，該基因盒係由基因啟動子、非阿拉伯芥泛素C9基因及SEQ ID NO:1之阿拉伯芥泛素C9基因3' UTR組成。在一個實施例中，該SEQ ID NO:1之阿拉伯芥泛素C9基因3' UTR係可以操作方式與非阿拉伯芥泛素C9基因轉殖基因之3'端連接。在另一實施例中，該3'未轉譯序列包含SEQ ID NO:1或與SEQ ID NO:1具有80、85、90、95、99或100%序列同一性之序列。

根據一個實施例，提供包含基因盒之核酸載體，該基因盒係由啟動子、非阿拉伯芥泛素C9基因及3' UTR組成，其中該啟動子係可以操作方式與非阿拉伯芥泛素C9基因的5'端連接及該SEQ ID NO:1之3' UTR係可以操作方式與該非阿拉伯芥泛素C9基因的3'端連接。在另一實施例中，該3'未轉譯序列包含SEQ ID NO:1或與SEQ ID NO:1具有80、85、90、95、99或100%序列同一性之序列。在另一實施例中，該3'未轉譯序列係由SEQ ID NO:1、或與SEQ ID NO:1具有80、85、90、95或99%序列同一性之664 bp序列組成。

在一個實施例中，提供核酸構築體，其包含啟動子及非阿拉伯芥泛素C9基因及視需要選用之以下元件中之一或多者：

- a) 5'未轉譯區；
- b) 內含子；及
- c) 3'未轉譯區，

其中，

該啟動子係由SEQ ID NO:2或已知的啟動子序列(例如阿拉伯芥泛素C9基因啟動子)組成；

該內含子區係由已知的內含子序列組成；及

該3'未轉譯區係由SEQ ID NO:1或與SEQ ID NO:1具有98%序列同

一性之序列組成；進一步地，其中該啟動子係可以操作方式與該轉殖基因連接，且各視需要選用之元件在存在時亦可以操作方式同時與啟動子及轉殖基因連接。在另一實施例中，提供轉殖基因細胞，其包含上文剛剛揭示之核酸構築體。在一個實施例中，該轉殖基因細胞為植物細胞，及在另一個實施例中，提供一種植物，其中該植物包含該等轉殖基因細胞。

在一個實施例中，提供一種核酸構築體，其包含啟動子及非阿拉伯芥泛素C9轉殖基因及視需要選用之以下元件中之一或多者：

a) 內含子；及

b) 3'未轉譯區，

其中，

該啟動子係由SEQ ID NO:2或已知的啟動子序列(例如阿拉伯芥泛素C9基因啟動子)組成；

該內含子區係由已知的內含子序列組成；

該3'未轉譯區係由SEQ ID NO:1或與SEQ ID NO:1具有98%序列同一性之序列組成；進一步地，其中該啟動子係可以操作方式與該轉殖基因連接且各可選用之元件在存在時亦可以操作方式同時與啟動子及轉殖基因連接。在另一實施例中，提供轉殖基因細胞，其包含上文剛剛揭示之核酸構築體。在一個實施例中，該轉殖基因細胞為植物細胞，及在另一實施例中，提供一種植物，其中該植物包含該等轉殖基因細胞。

根據一個實施例，該核酸載體進一步包含編碼可選擇標誌之序列。根據一個實施例，該重組基因盒係可以操作方式與農桿菌T-DNA邊界連接。根據一個實施例，該重組基因盒進一步包含第一及第二T-DNA邊界，其中該第一T-DNA邊界係可以操作方式與基因構築體之一端連接，及該第二T-DNA邊界係可以操作方式與基因構築體之另一端

連接。該第一及第二農桿菌T-DNA邊界可獨立地選自源自細菌菌株之T-DNA邊界序列，其選自由以下組成之群：胭脂鹼合成農桿菌T-DNA邊界、章魚鹼合成農桿菌T-DNA邊界、甘露鹼合成農桿菌T-DNA邊界、琥珀鹼合成農桿菌T-DNA邊界或其任何組合。在一個實施例中，提供農桿菌菌株，其選自由胭脂鹼合成菌株、甘露鹼合成菌株、琥珀鹼合成菌株或章魚鹼合成菌株組成之群，其中該菌株包含質體，其中該質體包含可以操作方式與選自SEQ ID NO:1或與SEQ ID NO:1具有80、85、90、95或99%序列同一性之序列之序列連接之轉殖基因。

適用於本發明所揭示構築體之受關注轉殖基因包括(但不限於)賦予(1)蟲害或疾病抗性，(2)除草劑耐受性，(3)提高價值之農藝特徵，諸如；產率提高、氮利用效率、水利用效率及營養品質，(4)蛋白質與DNA以位點特異性方式結合，(5)小RNA之表現及(6)可選擇標誌之編碼序列。根據一個實施例，該轉殖基因編碼賦予殺昆蟲劑抗性、除草劑耐受性、小RNA表現、氮利用效率、水利用效率或營養品質之可選擇標誌或基因產物。

### 1. 昆蟲抗性

亦描述作報導子基因之各種可選擇標誌可以操作方式與包含SEQ ID NO:1之阿拉伯芥泛素C9基因3' UTR或與SEQ ID NO:1具有80、85、90、95或99%序列同一性之序列連接。可接著將該等可以操作方式連接之序列併入至所選載體中以允許識別並篩選經轉形之植物(「轉形體」)。例示性昆蟲抗性編碼序列係相關技術已知的。作為可以操作方式與本發明之調控元件連接之昆蟲抗性編碼序列之實施例，提供以下特徵。提供例示性鱗翅目昆蟲抗性之編碼序列包括：*cry1A*；*cry1A.105*；*cry1Ab*；*cry1Ab*(截短型)；*cry1Ab-Ac*(融合蛋白質)；*cry1Ac*(以 Widestrike® 出售)；*cry1C*；*cry1F*(以 Widestrike® 出售)；*cry1Fa2*；*cry2Ab2*；*cry2Ae*；*cry9C*；*mocry1F*；*pinII*(蛋白酶抑

制蛋白質)；*vip3A(a)*；及*vip3Aa20*。提供例示性鞘翅目昆蟲抗性之編碼序列包括：*cry34Ab1*(以Herculex®出售)；*cry35Ab1*(以Herculex®出售)；*cry3A*；*cry3Bb1*；*dvsnf7*；及*mcry3A*。提供例示性多昆蟲抗性之編碼序列包括*ecry31.Ab*。昆蟲抗性基因之上述清單並非意指限制性。本發明包含任何昆蟲抗性基因。

## 2. 除草劑耐受性

亦描述作報導子基因之各種可選擇標誌可以操作方式與包含SEQ ID NO:1之阿拉伯芥泛素C9基因3' UTR或與SEQ ID NO:1具有80、85、90、95或99%序列同一性之序列連接。可接著將該等可以操作方式連接之序列併入至所選載體中以允許識別並篩選經轉形之植物(「轉形體」)。例示性除草劑耐受性編碼序列係相關技術中已知的。作為可以操作方式與本發明之調控元件連接之除草劑耐受性編碼序列之實施例，提供以下特徵。嘉磷塞除草劑包含藉由抑制EPSPS酵素(5-烯醇式丙酮醯莽草酸-3-磷酸合成酶)之作用模式。該酵素參與芳族胺基酸之生物合成，該芳族胺基酸為植物生長及發育所需。可用於抑制該酵素之各種催化機制係技術中已知的。編碼此等酵素之基因可以操作方式與本發明之基因調控元件連接。在一個實施例中，可選擇標誌基因包括(但不限於)編碼嘉磷塞抗性基因之基因，包括：突變體EPSPS基因，諸如*2mEPSPS*基因、*cp4 EPSPS*基因、*mEPSPS*基因、*dgt-28*基因；*aroA*基因；及嘉磷塞降解基因，諸如嘉磷塞乙醯轉移酶基因(*gat*)及嘉磷塞氧化酶基因(*gox*)。該等特徵目前以Gly-Tol™、Optimum® GAT®、Agrisure® GT及Roundup Ready®出售。針對草銨磷及/或雙丙胺磷化合物之抗性基因包括*dsm-2*、*bar*及*pat*基因。該*bar*及*pat*特徵目前以LibertyLink®出售。亦包括對2,4-D提供抗性之耐受性基因，諸如*aad-1*基因(應注意，*aad-1*基因對芳氧基苯氧基丙酸鹽除草劑具有進一步的活性)及*aad-12*基因(應注意，*aad-12*基因對吡啶基

氧基乙酸鹽合成植物生長素具有進一步的活性)。該等特徵以Enlist®作物保護技術出售。針對ALS抑制劑(磺醯脲、咪唑啉酮、三唑并嘧啶、嘧啶硫代苯甲酸鹽及磺醯胺基羰基三唑啉酮)之抗性基因係相關技術中已知的。該等抗性基因最通常係藉由ALS編碼基因序列之點突變產生。其他ALS抑制劑抗性基因包括*hra*基因、*csr1-2*基因、*Sr-HrA*基因及*surB*基因。一些該等特徵以商標名Clearfield®出售。抑制HPPD之除草劑包括吡唑酮，諸如苄草唑(pyrazoxyfen)、吡草酮(benzofenap)及苯唑草酮(topramezone)；三酮，諸如硝磺草酮(mesotrione)、磺草酮(sulcotrione)、環磺酮(tembotrione)、雙環磺草酮(benzobicyclon)；及二酮腈，諸如異噁唑草酮(isoxaflutole)。該等例示性HPPD除草劑可由已知的特徵耐受。HPPD抑制劑之實例包括*hppdPF\_W336*基因(就對異噁唑草酮抗性而言)及*avhppd-03*基因(就對硝磺草酮抗性而言)。苯腈(oxynil)除草劑耐受性特徵之一個實例包括*bxn*基因，其已顯示賦予除草劑/抗生素溴苯腈抗性。針對麥草畏(dicamba)之抗性基因包括麥草畏單甲氧酶基因(*dmo*)，如國際PCT公開案第WO 2008/105890號中所揭示。針對PPO或PROTOX抑制劑類除草劑(例如，亞喜芬(acifluorfen)、氟丙嘧草酯(butafenacil)、氟丙帕齊(fluproazil)、環戊噁草酮(pentoxazone)、唑酮草酯(carfentrazone)、異丙吡草酯(fluzolate)、吡草醚(pyraflufen)、苯草醚(aclonifen)、唑啉草酮(azafenidin)、丙炔氟草胺(flumioxazin)、氟烯草酸(flumiclorac)、甲羧除草醚(bifenox)、乙氧氟草醚(oxyfluorfen)、乳氟禾草靈(lactofen)、氟磺胺草醚(fomesafen)、乙羧氟草醚(fluoroglyphosate)及甲磺草胺(sulfentrazone))之抗性基因係相關技術中已知的。賦予PPO抗性之例示性基因包括野生型阿拉伯芥PPO酵素之過度表現(Lermontova I及Grimm B, (2000) Overexpression of plastidic protoporphyrinogen IX oxidase leads to resistance to the diphenyl-ether

herbicide acifluorfen. *Plant Physiol* **122**:75-83), 枯草桿菌 (*B. subtilis*) PPO 基因 (Li, X. 及 Nicholl D. 2005. Development of PPO inhibitor-resistant cultures and crops. *Pest Manag. Sci.* 61:277-285 及 Choi KW、Han O、Lee HJ、Yun YC、Moon YH、Kim MK、Kuk YI、Han SU 及 Guh JO, (1998) Generation of resistance to the diphenyl ether herbicide, oxyfluorfen, via expression of the *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene in transgenic tobacco plants. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**:558-560)。針對吡啶氧基或苯氧基丙酸及環己酮之抗性基因包括 ACC 酶抑制劑編碼基因 (例如, Acc1-S1、Acc1-S2 及 Acc1-S3)。賦予環己二酮及/或芳氧基苯氧基丙酸抗性之例示性基因包括吡氟氯禾靈 (haloxyfop)、禾草靈 (diclofop)、噁唑禾草靈 (fenoxypop)、吡氟禾草靈 (fluazifop) 及精喹禾靈 (quizalofop)。最終, 除草劑可抑制光合作用, 包括三嗪或苄腈, 其係藉由 *psbA* 基因 (耐受三嗪)、*ls+* 基因 (耐受三嗪) 及 *膦酶* 基因 (耐受苄腈) 提供耐受性。除草劑耐受性基因之上述清單並非意指限制性。本發明涵蓋任何除草劑耐受性基因。

### 3. 農藝特徵

亦描述作報導子基因之各種可選擇標誌可以操作方式與包含 SEQ ID NO:1 之阿拉伯芥泛素 C9 基因 3' UTR 或與 SEQ ID NO:1 具有 80、85、90、95 或 99% 序列同一性之序列連接。可接著將該等可以操作方式連接之序列併入至所選載體中以允許識別並篩選經轉形之植物 (「轉形體」)。例示性農藝特徵編碼序列係相關技術中已知的。作為可以操作方式與本發明之調控元件連接之農藝特徵編碼序列之實施例, 提供以下特徵: 如藉由 *pg* 基因提供之延遲果實軟化會抑制聚半乳糖醛酸酶酵素之產生, 該酵素是造成細胞壁中果膠分子分解原因, 並由此延緩水果軟化。另外, *acc* 基因之延遲果實成熟/衰老係作用抑制

初始*acc*合成酶基因之正常表現，從而導致乙烯產生之減少及果實成熟之延遲。而且，*accd*基因會代謝果實成熟激素乙烯之前驅物，從而導致果實成熟延遲。或者，*sam-k*基因藉由減少S-腺苷甲硫胺酸(SAM)(乙烯產生之底物)引起成熟之延遲。如藉由*cspB*基因提供之乾旱應力耐受性表型於水應力條件下藉由保留RNA穩定性及轉譯維持正常細胞功能。另一實例包括*EcBetA*基因，其可催化產生賦予對水應力耐受性之滲透保護劑化合物甘胺酸甜菜鹼。此外，*RmBetA*基因催化產生賦予對水應力耐受性之滲透保護劑化合物甘胺酸甜菜鹼。光合作用及產量之提高係藉由表現與一或多個內源轉錄因子相互作用以調控植物的日/夜生理過程之蛋白質的*bbx32*基因提供。乙醇生成可藉由表現編碼熱穩定 $\alpha$ -澱粉酶酵素之*amy797E*基因而增加，該熱穩定 $\alpha$ -澱粉酶酵素藉由增加用於降解澱粉之澱粉酶之熱穩定性來提高生物乙醇生成。最終，經改質之胺基酸組合物可藉由表現編碼二氫二吡啶甲酸合成酶酵素之*cordapA*基因產生，該二氫二吡啶甲酸合成酶酵素增加胺基酸離胺酸生成。農藝特徵編碼序列之上述清單並非意指限制性。本發明涵蓋任何農藝特徵編碼序列。

#### 4.DNA結合蛋白質

亦描述作報導子基因之各種可選擇標誌可以操作方式與包含SEQ ID NO:1之阿拉伯芥泛素C9基因3' UTR或與SEQ ID NO:1具有80、85、90、95或99%序列同一性之序列連接。可接著將該等可以操作方式連接之序列併入至所選載體中以允許識別並篩選經轉形之植物(「轉形體」)。例示性DNA結合蛋白質編碼序列係相關技術中已知的。作為可以操作方式與本發明之調控元件連接之DNA結合蛋白質編碼序列之實施例，以下類型之DNA結合蛋白質可包括；鋅指、Talen、CRISPR及大範圍核酸酶。DNA結合蛋白質編碼序列之上述清單並非意指限制性。本發明涵蓋任何DNA結合蛋白質編碼序列。

## 5.小RNA

亦描述作報導子基因之各種可選擇標誌可以操作方式與包含SEQ ID NO:1之阿拉伯芥泛素C9基因3' UTR或與SEQ ID NO:1具有80、85、90、95或99%序列同一性之序列連接。可接著將該等可以操作方式連接之序列併入至所選載體中以允許識別並篩選經轉形之植物(「轉形體」)。例示性小RNA特徵係相關技術中已知的。作為可以操作方式與本發明調控元件連接之小RNA編碼序列之實施例，提供以下特徵。例如，*抗-efe*小RNA之延遲果實成熟/衰老藉由經由使編碼乙烯形成酵素之ACO基因沉默抑制生成乙烯來延遲成熟。*ccomt*小RNA之經改變之木質素生成藉由抑制內源S-腺苷-L-甲硫胺酸:反式-咖啡醯基CoA 3-O-甲基轉移酶(CCOMT基因)來減小愈創木基(G)木質素含量。另外，在茄疣(*Solanum verrucosum*)中之黑點瘀斑(Black Spot Bruise)耐受性可藉由*Ppo5*小RNA而減低，該*Ppo5*小RNA觸發*Ppo5*轉錄本降解以阻斷黑點瘀斑形成。亦包括*dvsnf7*小RNA，其藉由包含西方玉米根蟲(Western Corn Rootworm)*Snf7*基因之240 bp片段之dsRNA抑制西方玉米根蟲。經改質之澱粉/碳水化合物可來自小RNA諸如*pPhL*小RNA(降解PhL轉錄本以限制藉由澱粉降解形成還原糖)及*pR1*小RNA(降解R1轉錄本以限制藉由澱粉降解形成還原糖)產生。另外的優點諸如丙烯醯胺之還原來自會觸發*Asn1*降解以損及天冬醯胺酸形成並還原聚丙烯醯胺之*asn1*小RNA。最終，*pgas ppo抑制*小RNA之非褐變表型導致抑制PPO產生具有非褐變表型之蘋果。小RNA之上述清單並非意指限制性。本發明包含任何小RNA編碼序列。

## 6.可選擇標誌

亦描述作報導子基因之各種可選擇標誌可以操作方式與包含SEQ ID NO:1之阿拉伯芥泛素C9基因3' UTR或與SEQ ID NO:1具有80、85、90、95或99%序列同一性之序列連接。可接著將該等可以操作方

式連接之序列併入至所選載體中以允許識別並篩選經轉形之植物(「轉形體」)。可使用許多方法以證實經轉形植物中可選擇標誌之表現，包括(例如)DNA定序及PCR(聚合酶鏈反應)、南方墨點、RNA墨點、用於偵測自載體表現之蛋白質之免疫學方法。然而，通常，經由目測觀察當表現時產生著色產物之蛋白質來觀察報導子基因。例示性報導子基因係相關技術中已知的及係編碼 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(GUS)、螢光素酶、綠色螢光蛋白質(GFP)、黃色螢光蛋白質(YFP、Phi-YFP)、紅色螢光蛋白質(DsRFP、RFP等)、 $\beta$ -半乳糖苷酶及類似(參見 Sambrook 等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第三版, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 2001，其內容係以全文引用方式併入本文中)。

可選擇標誌基因係用於篩選經轉形之細胞或組織。可選擇標誌基因包括編碼抗生素抗性之基因，諸如彼等編碼新黴素磷酸轉移酶II(NEO)、壯觀黴素/鏈酶素抗性(AAD)及潮黴素磷酸轉移酶(HPT或HGR)者以及賦予除草化合物抗性之基因。除草劑抗性基因一般而言編碼對除草劑不敏感之經改質之靶蛋白質或編碼植物中在除草劑可作用前降解或解毒其之酵素。例如，已藉由使用編碼突變體靶酵素、5-烯醇式丙酮醯莽草酸-3-磷酸鹽合成酶(EPSPS)之基因，獲得對嘉磷塞抗性。針對EPSPS之基因及突變體係熟知的，並進一步述於下文。已藉由使用編碼PAT或DSM-2、腈酶、AAD-1或AAD-12之細菌基因(其分別為解毒其各自除草劑之蛋白質之實例)獲得對草銨磷、溴苯腈及2,4-二氯苯氧基乙酸鹽(2,4-D)抗性。

在一個實施例中，除草劑可抑制生長點或分生組織，包括咪唑啉酮或磺醯脲，及針對乙醯羧基酸合成酶(AHAS)及乙醯乳酸合成酶(ALS)對該等除草劑之抗性/耐受性之基因係熟知的。嘉磷塞抗性基因包括突變體5-烯醇式丙酮醯莽草酸-3-磷酸合成酶(EPSP)及 *dgt-28* 基因

(經由引入重組核酸及/或初始EPSP基因之活體內突變之各種形式)、分別係*aroA*基因及嘉磷塞乙醯基轉移酶(GAT)基因。針對其他磷醯基化合物之抗性基因包括源自鏈黴菌物種之*bar*及*pat*基因,包括吸水鏈黴菌(*Streptomyces hygroscopicus*)及綠色產色鏈黴菌(*Streptomyces viridichromogenes*)、及吡啶氧基或苯氧基丙酸及環己酮(ACC酶抑制劑編碼基因)。賦予環己二酮及/或芳氧基苯氧基丙酸(包括吡氟氯禾靈、禾草靈、噁唑禾草靈、吡氟禾草靈、精喹禾靈)抗性之例示性基因包括乙醯輔酶A羧化酶(ACC酶)之基因; Acc1-S1、Acc1-S2及Acc1-S3。在一個實施例中,除草劑可抑制光合作用,包括三嗪(*psbA*及1s+基因)或苄腈(腈酶基因)。另外,此等可選擇標誌可包括陽性選擇標誌,諸如磷酸甘露糖異構酶(PMI)酵素。

在一個實施例中,可選擇標誌基因包括(但不限於)編碼以下之基因: 2,4-D; 新黴素磷酸轉移酶II; 氰醯胺水合酶; 天冬胺酸激酶; 二氫二吡啶甲酸合成酶; 色胺酸脫羧基酶; 二氫二吡啶甲酸合成酶及減敏天冬胺酸激酶; *bar*基因; 色胺酸脫羧基酶; 新黴素磷酸轉移酶(NEO); 潮黴素磷酸轉移酶(HPT或HYG); 二氫葉酸還原酶(DHFR); 草丁膦乙醯轉移酶; 2,2-二氯丙酸脫鹵素酶; 乙醯羧基酸合成酶、5-烯醇式丙酮醯莽草酸磷酸合成酶(*aroA*); 鹵芳基腈酶; 乙醯基輔酶A羧化酶; 二氫蝶酸合成酶(*su1 I*); 及32 kD光系統II多肽(*psbA*)。一個實施例亦包括編碼對下列物質抗性之可選擇標誌基因: 氯黴素; 甲胺喋呤; 潮黴素; 壯觀黴素; 溴苯腈; 嘉磷塞; 及草丁膦。可選擇標誌基因之上述清單並非意指限制性。本發明包含任何報導子或可選擇標誌基因。

在一些實施例中,該等編碼序列係經合成以在植物中最佳表現。例如,在一個實施例中,已藉由密碼子最佳化改質基因之編碼序列以增強在植物中之表現。殺昆蟲劑抗性轉殖基因、除草劑耐受性轉

殖基因、氮利用效率轉殖基因、水利用效率轉殖基因、營養品質轉殖基因、DNA結合轉殖基因或可選擇標誌轉殖基因可經最佳化以在特定植物物種中表現或是或者可經改質以在雙子葉或單子葉植物中最佳表現。可由在受關注特定植物物種中以最大量表現之蛋白質中最高頻率密碼子判定植物較佳的密碼子。在一個實施例中，編碼序列、基因或轉殖基因係設計成以較高水平在植物中表現，從而導致轉形效率較高。基因之植物最佳化之方法係熟知的。關於合成DNA序列之最佳化及產生之指導可在例如 WO2013016546、WO2011146524、WO1997013402、美國專利第6166302號及美國專利第5380831號中發現，該等專利係以引用的方式併入本文中。

### 轉形

用於轉形植物之適宜方法包括可藉此將DNA引入至細胞中之任何方法，例如，但不限於：電穿孔(參見，例如，美國專利5,384,253)；微發射體轟擊(參見，例如，美國專利5,015,580、5,550,318、5,538,880、6,160,208、6,399,861及6,403,865)；農桿菌介導之轉形(參見，例如，美國專利5,635,055、5,824,877、5,591,616；5,981,840及6,384,301)；及原生質體轉形(參見，例如，美國專利5,508,184)。

DNA構築體可利用技術諸如以碳化矽纖維攪拌直接引入至植物細胞之基因組DNA中(參見，例如，美國專利5,302,523及5,464,765)，或DNA構築體可利用基因槍法諸如DNA粒子轟擊(參見，例如，Klein等人(1987) *Nature* 327:70-73)直接引入至植物組織中。或者，DNA構築體可藉由奈米粒子轉形引入至植物細胞中(參見，例如，美國專利公開案第20090104700號，該案係以其全文引用的方式併入本文中)。

此外，基因轉移可使用非農桿菌細菌或病毒諸如根瘤菌屬

(*Rhizobium sp.*)NGR234、苜蓿中華根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)、百脈根根瘤菌(*Mesorhizobium loti*)、馬鈴薯病毒X、椰菜花葉病毒及木薯葉脈花葉病毒及/或菸草花葉病毒實現，參見，例如，Chung等人(2006) Trends Plant Sci. 11(1):1-4。

經由轉形技術之應用，實質上任何植物物種之細胞可穩定地轉形，及該等細胞可藉由熟知的技術開發成轉殖基因植物。例如，可尤其用於棉轉形情況中之技術述於美國專利5,846,797、5,159,135、5,004,863及6,624,344中；用於特定轉形芥屬植物之技術述於例如美國專利5,750,871中；用於轉形大豆之技術述於例如美國專利6,384,301中；及用於轉形玉米之技術述於例如美國專利7,060,876及5,591,616、及國際PCT公開案WO 95/06722中。

於達成外源核酸至受體細胞之遞送後，一般識別經轉形之細胞以進行進一步培養及植物再生。為提高識別轉形體的能力，可期望與用於產生轉形體之轉形載體使用可選擇標誌基因。在一個例示性實施例中，經轉形之細胞群可藉由將該等細胞暴露於選擇性試劑進行分析，或該等細胞可基於所期望的標誌基因特徵進行篩選。

可在支持植物之再生的培養基中培養暴露於選擇性試劑存活之細胞或在篩選分析中評分為陽性之細胞。在一個實施例中，任何適宜植物組織培養基可藉由包括其他物質諸如生長調節劑進行改良。可基於具有生長調節劑之基礎培養基保持組織直到取得量足以開始植物再生努力之組織，或遵照重複幾輪人工篩選，直到組織之形態適用於再生(例如，至少2週)，接著轉移至有利於嫩枝形成之培養基。週期性地轉移培養物直到已發生足夠的嫩枝形成。一旦形成嫩枝，立刻將其轉移至有利於根形成之培養基。一旦形成足量的根，可將植物轉移至土壤以進一步生長及成熟。

## 分子驗證

可藉由選擇或篩選工程化植物材料的由於轉形DNA時所存在之標誌基因編碼之特徵而來識別經轉形之植物細胞、癒傷組織、組織或植物並分離。例如，可藉由基於包含抑制量之由轉形基因構築體賦予抗性之抗生素或除草劑之培養基生長工程化植物材料，來進行選擇。另外，經轉形之植物及植物細胞亦可藉由基於可存於重組核酸構築體上之任何可見標誌基因(例如， $\beta$ -葡萄糖苷酸酶、螢光素酶或*gfp*基因)之活性篩選來識別。熟習此項技術者熟知此等選擇及篩選方法。熟習此項技術者已知可用於識別轉殖基因植物之分子驗證方法。下文進一步描述若干例示性方法。

據描述分子信標係用於序列偵測。簡言之，FRET寡核苷酸探針設計成與側接基因組及插入DNA結重疊。FRET探針之獨特結構使得其包含保持螢光及淬滅部分密切接近之二級結構。FRET探針及PCR引物(一個引物在插入DNA序列中及一個引物在側接基因組序列中)於存在熱穩定聚合酶及dNTP下進行循環。於成功PCR擴增後，FRET探針雜交至靶序列，導致移除探針二級結構並將螢光及淬滅部分空間分離。螢光信號指示由於成功擴增及雜交所致之側接基因組/轉殖基因插入序列之存在。偵測(為)擴增反應之此分子信標分析係本發明之一個實施例。

水解探針分析(另稱為TAQMAN<sup>®</sup>(Life Technologies, Foster City, Calif.))係一種偵測並量化DNA序列之存在之方法。簡言之，FRET寡核苷酸探針設計為一個寡聚物在轉殖基因中及一個在側接基因組序列中以進行品系特異性偵測。FRET探針及PCR引物(一個引物在插入DNA序列中及一個在側接基因組序列中)於存在熱穩定聚合酶及dNTP下進行循環。FRET探針之雜交導致螢光部分裂解並釋放遠離FRET探針上之淬滅部分。螢光信號指示由於成功擴增及雜交所致之側接/轉殖基因插入序列之存在。偵測(為)擴增反應之此水解探針分析係本發

明之一個實施例。

KASPar®分析係一種偵測並量化DNA序列之存在之方法。簡言之，利用稱作KASPar®分析系統之基於聚合酶鏈反應(PCR)之分析，篩選包含經整合之基因表現盒多核苷酸之基因組DNA樣本。用於實施本發明之KASPar®分析可利用包含多引物之KASPar® PCR分析混合物。用於PCR分析混合物中之引物可包含至少一個正向引物及至少一個反向引物。正向引物包含對應於DNA多核苷酸之特異性區之序列，及反向引物包含對應於基因組序列之特異性區之序列。此外，用於PCR分析混合物中之引物可包含至少一個正向引物及至少一個反向引物。例如，KASPar® PCR分析混合物可使用兩個對應於兩個不同等位基因之正向引物及一個反向引物。其中一個正向引物包含對應於內源基因組序列之特異性區之序列。第二正向引物包含對應於DNA多核苷酸之特異性區之序列。該反向引物包含對應於基因組序列之特異性區之序列。偵測擴增反應之此KASPar®分析係本發明之一個實施例。

在一些實施例中，螢光信號或螢光染料係選自由HEX螢光染料、FAM螢光染料、JOE螢光染料、TET螢光染料、Cy 3螢光染料、Cy 3.5螢光染料、Cy 5螢光染料、Cy 5.5螢光染料、Cy 7螢光染料及ROX螢光染料組成之群。

在其他實施例中，使用能夠以可由流式細胞儀偵測之濃度範圍染色細胞DNA且具有可藉由即時熱循環儀偵測之螢光發射光譜之適宜的第二螢光DNA染料，運行擴增反應。熟習此項技術者應瞭解，其他核酸染料係已知的並不斷地識別出來。可使用具有適宜激發及發射光譜之任何適宜核酸染料，諸如YO-PRO-1®、SYTOX Green®、SYBR Green I®、SYTO11®、SYTO12®、SYTO13®、BOBO®、YOYO®及TOTO®。在一個實施例中，第二螢光DNA染料為以小於10  $\mu$ M、小於4  $\mu$ M或小於2.7  $\mu$ M使用之SYTO13®。

在其他實施例中，下代定序(NGS)可用於偵測。如Brautigma等人，2010所述，DNA序列分析可用於判定經分離並擴增之片段之核苷酸序列。經擴增之片段可經分離並次選殖至載體中且利用鏈終止子法(亦稱為Sanger定序)或染料終止子定序進行定序。此外，擴增可藉由下代定序進行定序。NGS技術不需要次選殖步驟，及可在一個步驟中完成多個定序閱讀。三個NGS平臺可自市面購得，購自454 Life Sciences / Roche之Genome Sequencer FLX™，購自Solexa之Illumina Genome Analyser™及Applied Biosystems之SOLiD™(全稱為：「藉由寡聚物接合及偵測定序」)。此外，存在最新開發之兩種單分子定序方法。該等包括購自Helicos Bioscience™之真單分子定序(tSMS)及購自Pacific Biosciences之單分子即時™定序(SMRT)。

由454 Life Sciences/Roche出售之Genome Sequencer FLX™為長讀NGS，其係使用乳液PCR及焦磷酸定序以產生定序讀值。可使用300至800 bp之DNA片段或包含3至20 kb之片段之片段庫。該等反應每次操作可產生超過一百萬個約250至400個鹼基之讀值，總計250至400百萬鹼基。該技術產生最長讀值，但每次操作之總序列輸出較其他NGS技術低。

由Solexa™出售之Illumina Genome Analyser™係短讀NGS，其利用藉由合成方法與經螢光染料標記之可逆終止子核苷酸之定序及以固相橋式PCR為基礎。可使用包含至多10 kb之DNA片段之配對端點定序庫之構築體。該等反應產生超過100百萬個為35至76個鹼基長的短讀。該數據每次操作可產生30至60億鹼基。

由Applied Biosystems™出售之藉由寡聚物接合及偵測定序(SOLiD)系統係短讀技術。該NGS技術使用至多10 kb長的片段化雙股DNA。該系統利用藉由經染料標記之寡核苷酸引物之接合及乳液PCR之定序以產生十億短讀而每次操作得到至多300億鹼基之總序列輸

出。

Helicos Bioscience™之tSMS及Pacific Biosciences™之SMRT應用不同方法，其使用單DNA分子以進行序列反應。該tSMS Helicos™系統每次操作產生多達8億短讀而得到210億鹼基。使用經螢光染料標記之虛擬終止子核苷酸完成該等反應，其描述作為「藉由合成定序」法。

由Pacific Biosciences™出售之SMRT下代定序系統使用藉由合成之即時定序。由於不受可逆終止子限制的緣故，該技術可產生讀值為多達1,000 bp的長度。利用該技術，每天可產生相當於二倍體人類基因組之一倍覆蓋之原始讀值輸出量。

在另一個實施例中，可利用墨點分析，包括西方墨點、北方墨點及南方墨點完成偵測。此等墨點分析為通常用於生物研究中以識別並量化生物樣本之技術。該等分析包括首先藉由電泳分離凝膠中之樣本組分，接著自凝膠轉移經電泳分離之組分至由諸如硝基纖維素、聚偏二氟乙烯(PVDF)或尼龍之材料製成之轉移膜。分析物亦可直接點於該等支撐件上或藉由施加真空、毛細管作用或壓力導引至支撐件上之特定區域而無事先分離。接著，該等轉移膜通常經歷轉移後處理以增強彼此區分並目測或藉由自動讀取器偵測分析物之能力。

在另一個實施例中，可利用ELISA分析完成偵測，該ELISA分析使用固相酶免疫分析法以偵測液體樣本或濕樣本中物質(通常抗原)之存在。樣本中之抗原附著至板表面。接著，將另一特異性抗體施覆於表面上，故其可與抗原結合。該抗體與酵素連接，及在最後一步，添加包含酵素底物之物質。隨後的反應產生可偵測之信號，最通常係底物色變。

#### 轉殖基因植物

在一個實施例中，植物、植物組織或植物細胞包含阿拉伯芥泛

素C9基因3'UTR。在一個實施例中，植物、植物組織或植物細胞包含選自SEQ ID NO:1之序列或與選自SEQ ID NO:1之序列具有80%、85%、90%、95%或99.5%序列同一性之序列之阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR。在一個實施例中，植物、植物組織或植物細胞包含基因表現盒，該基因表現盒包含可以操作方式與非阿拉伯芥泛素C9基因連接之選自SEQ ID NO:1或與選自SEQ ID NO:1之序列具有80%、85%、90%、95%或99.5%序列同一性之序列之序列。在一個例示性實施例中，植物、植物組織或植物細胞包含基因表現盒，該基因表現盒包含可以操作方式與轉殖基因連接之阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR，其中該轉殖基因可為殺昆蟲劑抗性轉殖基因、除草劑耐受性轉殖基因、氮利用效率轉殖基因、水利用效率轉殖基因、營養品質轉殖基因、DNA結合轉殖基因、可選擇標誌轉殖基因或其組合。

根據一個實施例，提供植物、植物組織或植物細胞，其中該植物、植物組織或植物細胞包含阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR衍生之可以操作方式與轉殖基因連接之序列，其中該阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR衍生之序列包含序列SEQ ID NO:1或與SEQ ID NO:1具有80%、85%、90%、95%或99.5%序列同一性之序列。在一個實施例中，提供一種植物、植物組織或植物細胞，其中該植物、植物組織或植物細胞包含可以操作方式與非阿拉伯芥泛素C9基因連接之SEQ ID NO:1或與SEQ ID NO:1具有80%、85%、90%、95%或99.5%序列同一性之序列。在一個實施例中，該植物、植物組織或植物細胞為雙子葉或單子葉植物或衍生自雙子葉或單子葉植物之細胞或組織。在一個實施例中，該植物係選自由玉米、小麥、稻米、蜀黍、燕麥、黑麥、香蕉、甘蔗、大豆、棉花、向日葵及芥花菜組成之群。在一個實施例中，該植物為玉米。根據一個實施例，該植物、植物組織或植物細胞包含可以操作方式與非阿拉伯芥泛素C9基因連接之SEQ ID NO:1或與SEQ ID NO:1具

有80%、85%、90%、95%或99.5%序列同一性之序列。在一個實施例中，該植物、植物組織或植物細胞包含可以操作方式與轉殖基因連接之啟動子，其中該啟動子係由SEQ ID NO:1或與SEQ ID NO:1具有80%、85%、90%、95%或99.5%序列同一性之序列組成。根據一個實施例，將包含可以操作方式與轉殖基因連接之阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR序列之基因構築體併入至植物、植物組織或植物細胞之基因組中。

在一個實施例中，根據本文所揭示方法之植物、植物組織或植物細胞可為雙子葉植物。該雙子葉植物、植物組織或植物細胞可為(但不限於)苜蓿、油菜籽、芥花菜、印第安芥(Indian mustard)、埃塞俄比亞芥(Ethiopian mustard)、大豆、向日葵、棉花、豆、青花菜、捲心菜、花椰菜、芹菜、黃瓜、茄子、萵苣；甜瓜、豌豆、辣椒、花生、馬鈴薯、南瓜、蘿蔔、菠菜、甜菜、向日葵、菸草、番茄及西瓜。

熟習此項技術者當知曉，在外源序列穩定地併入轉殖基因植物中並證實為可操作後，可藉由性交將其引入至其他植物中。可使用多種標準育種技術中之任一種，端視意欲雜交之物種而定。

本發明亦包含上述轉殖基因植物之種子，其中該種子具有包含本發明之基因調控元件之轉殖基因或基因構築體。本發明進一步包含上述轉殖基因植物之子代、純系、細胞系或細胞，其中該子代、純系、細胞系或細胞具有包含本發明基因調控元件之轉殖基因或基因構築體。

本發明亦包含上述轉殖基因植物之培養，其中該轉殖基因植物具有包含本發明基因調控元件之轉殖基因或基因構築體。因此，此等轉殖基因植物可經工程化以尤其藉由利用根據本發明之核酸分子轉形而具有一或多個期望的包含本發明基因調控元件之特徵或轉殖基因品

系，及可藉由熟習此項技術者已知的任何方法收穫或培養。

#### 表現轉殖基因之方法

在一個實施例中，在植物中表現至少一個轉殖基因之方法包括生長包含可以操作方式與至少一個轉殖基因或多連接子序列連接之阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR之植物。在一個實施例中，該阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR由選自SEQ ID NO:1或與選自SEQ ID NO:1之序列具有序列80%、85%、90%、95%或99.5%同一性之序列之序列組成。在一個實施例中，提供一種在植物中表現至少一個轉殖基因之方法，其包括生長包含阿拉伯芥泛素C9基因啟動子及可以操作方式與至少一個轉殖基因連接之阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR之植物。在一個實施例中，提供一種在植物組織或植物細胞中表現至少一個轉殖基因之方法，其包括培養包含可以操作方式與至少一個轉殖基因連接之阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR之植物組織或植物細胞。

在一個實施例中，提供一種在植物中表現至少一個轉殖基因之方法，其包括生長包含基因表現盒之植物，該基因表現盒包含可以操作方式與至少一個轉殖基因連接之阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR。在一個實施例中，該阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR由選自SEQ ID NO:1之序列或與選自SEQ ID NO:1之序列具有80%、85%、90%、95%或99.5%序列同一性之序列組成。在一個實施例中，提供一種在植物中表現至少一個轉殖基因之方法，其包括生長包含基因表現盒之植物，該基因表現盒包含阿拉伯芥泛素C9基因啟動子及可以操作方式與至少一個轉殖基因連接之阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR。在一個實施例中，提供一種在植物中表現至少一個轉殖基因之方法，其包括生長包含基因表現盒之植物，該基因表現盒包含可以操作方式與至少一個轉殖基因之阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR。在一個實施例中，提供一種在植物組織或植物細胞中表現至少一個轉殖基因之方法，其包括培養包含基因表

現盒之植物組織或植物細胞，該基因表現盒包含可以操作方式與至少一個轉殖基因連接之阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR。在一個實施例中，一種在植物組織或植物細胞中表現至少一個轉殖基因之方法包括培養包含基因表現盒、阿拉伯芥泛素C9基因啟動子及可以操作方式與轉殖基因連接之阿拉伯芥泛素C9基因3'UTR之植物組織或植物細胞。

提供以下實例以說明某些特定特徵及/或實施例。該等實例不應解釋為將本發明限制於所例舉的特定特徵或實施例。

### 實例

實例1：源自阿拉伯芥泛素C9基因之最佳化調控元件之組合之新穎設計

稱作3'未轉譯區(3' UTR)之基因特異性下游多核苷酸序列通常在活體內係多功能的。RNA處理及成熟已經識別為轉錄後控制真核基因表現之關鍵控制點(Szostak及Gebauer, 2012；Wilusz及Spector, 2010；Barrett等人，2012；及Moore, 2005)。該等多核苷酸序列可影響核輸出速率、亞細胞定位、轉錄穩定性及轉譯。此外，3' UTR為就藉由小非編碼RNA控制而言之關鍵靶位點。雖然許多該等機制下調基因表現，但此調節亦可用於有效地將轉錄本定位至特定細胞類型以進行穩定積聚及於隨後基因表現(Patel等人，2006)。藉由評估與阿拉伯芥泛素C9啟動子或與其他已知啟動子相關聯之鄰接染色體序列，識別出664 bp 3' UTR多核苷酸序列(SEQ ID NO:1)並分離以用於異源編碼序列之表現。

SEQ ID NO:1；

```

acaataactgtcctaaggaagagccctaataaactctctatttctatgtaatgatctttatagacttctctgtcttataaaatttgaaga
caggatcagtaagaaattattgatctccattctatggaattgtaaagctaaatcatcatcccgtctgctgtttctttattgcgtgatgccgatgcg
tctctgtgtttatcaaggctcatattatttggattttattctgtccaaagcccaactagctacaatcgtaacctttccgttttcgtaaacattattaa
cttacatagtaaacattttcatttttagtattatgtgggcaalgatitagttaaattggtgatggggcctaagagtgaagttgttcatgagttaagaltg
tgattgtgatccatctggaacaatttaataaaatgggacaaaggaattatcactttgaagttgaccaatttaagatttacaataaatagtaaaact
attaaatcaccttttccccaaataatactcaaacgggtttagccattagtgtactaacattatggtataaagaccttgaaaaaacgggttact
ttttatggtataaccaactattatgacacttttgtttcaaggttctgtttcagtgatggagtatagtat

```

## 實例2：載體構築(pDAB122807)

建構pDAB122807載體以併入側接轉殖基因之調節多核苷酸序列之新穎組合。該載體構築體pDAB122807包含基因表現盒，其中該 *cry34Ab1* 轉殖基因(源自蘇力桿菌(*B. thurengiensis*)之報導子基因)係藉由 SEQ ID NO:2 之木薯葉脈花葉病毒啟動子(CsVMV 啟動子；Verdaguer等人，(1996) *Plant Molecular Biology* 31:1129-1139)驅動，且側接SEQ ID NO:1之阿拉伯芥泛素C9 3' UTR(*At Ubi9 3'UTR*)。該基因表現盒之圖式顯示於圖1中且以SEQ ID NO:3提供。該載體亦包含可選擇標誌基因表現盒，其包含由玉米泛素1啟動子(*Zm Ubi1* 啟動子；Christensen等人，(1992) *Plant Molecular Biology* 18: 675-689)驅動之 *aad-1* 轉殖基因(AAD-1；美國專利第7,838,733號)並藉由玉米脂酶 3' UTR(*Zm Lip 3'UTR*；美國專利第7,179,902號)終止。該基因表現盒之圖式顯示於圖1中且以SEQ ID NO:4提供。藉由合成新穎設計之自阿拉伯芥泛素C9之3'UTR(*At UBi9 3'UTR*)及選殖啟動子至GeneArt Seamless Cloning™(Life Technologies)進入載體中來建構該構築體。所得的進入載體包含終止 *cry34Ab1* 轉殖基因之阿拉伯芥泛素C9 3'UTR，及利用Gateway™選殖系統(Life Technologies)整合至目標載體中並經電穿孔至根癌農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 DAt13192中(國際專利公開案第WO2012016222號)。獲得所得二元質體之純系pDAB122807且分離質體DNA並藉由限制酶消化及定序證實。所得構築體包含驅動轉殖基因之組成性表現之調控元件之組合。

陰性對照構築體pDAB101556經組裝，其包含黃色螢光蛋白質(YFP；Shagin等人，(2004) *Mol Biol Evol* 21；841-50)報導子基因代替 *cry34Ab1* 基因 (圖2)且包含玉米泛素1啟動子(Zm Ubi1啟動子)及玉米過氧化物酶5 3'UTR(Zm Per5 3'UTR；美國專利第6,699,984號)調控元件。*aad-1*表現盒與pDAB122807中所呈現相同。使用與彼等針對pDAB122807者相同的試劑及方案將該控制構築體轉形至植物中。

### 實例3：玉米轉形

#### 根癌農桿菌之轉形

將二元表現載體轉形至根癌農桿菌菌株DA13192(RecA缺乏型三元菌株)中(國際專利公開案第WO2012016222號)。篩選細菌純系，及分離二元質體DNA並經由限制酶消化證實。

#### 農桿菌培養起始

藉由甘油原液劃線培養農桿菌培養物至AB最低培養基(Gelvin, S., 2006, *Agrobacterium Virulence Gene Induction*, Wang, K. 編, *Agrobacterium Protocols*, 第二版第1卷, Humana Press, 第79頁；製成不含蔗糖但含5 g/L葡萄糖及15 g/L Bacto™瓊脂)上並於20°C下在黑暗中培養3天。接著將農桿菌培養物劃線培養至YEP培養基板(Gelvin, S., 2006, *Agrobacterium Virulence Gene Induction*, Wang, K. 編, *Agrobacterium Protocols*, 第二版, 第1卷, Humana Press, 第79頁)上並於20°C下在黑暗中培養1天。

在實驗當天，以適合實驗大小的體積製備接種培養基(2.2 g/L MS鹽、68.4 g/L蔗糖、36 g/L葡萄糖、115 mg/L L-脯胺酸、2 mg/L甘胺酸、100 mg/L myo-肌醇、0.05 mg/L菸鹼酸、0.5 mg/L吡哆素HCl、0.5 mg/L硫胺素HCl)與乙醯丁香酮(acetosyringone)之混合物。將乙醯丁香酮在100%二甲亞砷中之1M儲備溶液添加至接種培養基以製得200 μM之最終乙醯丁香酮濃度。

就各構築體而言，自YEP板將1至2圈農桿菌懸浮於無菌、可棄式50 ml離心管內的15 ml接種培養基/乙醯丁香酮混合物中及在分光光度計中測量溶液於600 nm下之光學密度(O.D.<sub>600</sub>)。接著使用額外的接種培養基/乙醯丁香酮混合物將該懸浮液稀釋減低至0.25至0.35 O.D.<sub>600</sub>。接著於使用前在室溫下將農桿菌懸浮液之管水平置於設在約75 rpm之平臺搖晃器上1至4小時。

### 玉米轉形

實驗構築體係藉由農桿菌介導之轉形自自交系玉米c.v.B104分離得的未成熟胚胎而轉形至玉米中。所使用的方法類似於彼等為Ishida等人，(1996) *Nature Biotechnol* 14:745-750及Frame等人，(2006) *Plant Cell Rep* 25:1024-1034所公開者，然而，經若干修改及改善以使該方法適用於高通量轉形。用於在玉米中產生許多轉殖基因品系之方法之一個實例提供於美國專利申請公開案第US 2013/0157369 A1號中，該實例係以胚胎感染及共培養步驟開始。

### 實例4：T<sub>0</sub>時複本數之分子驗證

於存在轉殖基因之V2-3葉階段，使用*cry34Ab1*及*aad-1*定量PCR分析採集推定轉殖基因玉米植物樣本。使用MagAttract<sup>®</sup> DNA提取套組(Qiagen)按照製造商說明書，自4個葉片提取總DNA。

為偵測受關注基因，藉由包含針對*cry34Ab1*基因之經FAM-標記之螢光探針及針對內源轉化酶參考基因對照之經HEX標記之螢光探針之TaqMan<sup>®</sup>引物/探針組來擴增基因特異性DNA片段。以下引物係用於*cry34Ab1*及轉化酶內源參考基因擴增。

### *Cry34Ab1*引物/探針：

正向引物：TQ.8v6.1.F: GCCATACCCTCCAGTTG (SEQ ID NO:6)

反向引物：TQ.8v6.1.R: GCCGTTGATGGAGTAGTAGATGG (SEQ ID NO:7)

探針：TQ.8v6.1.MGB.P: 5'-/56-FAM/ CCGAATCCAACGGCTTCA  
/ MGB (SEQ ID NO:8)

轉化酶引物：

正向引物：轉化酶F：TGGCGGACGACGACTTGT (SEQ ID  
NO:9)

反向引物：轉化酶R：AAAGTTTGGAGGCTGCCGT (SEQ ID  
NO:10)

轉化酶探針：5'-/5HEX/CGAGCAGACCGCCGTGTACTT  
/3BHQ\_1/-3' (SEQ ID NO:11)

接著，在最終體積為10  $\mu$ l的反應中進行PCR反應，該反應包含5  $\mu$ l Roche LightCycler<sup>®</sup> 480 探針預混液 (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN)；各0.4  $\mu$ l的來自10  $\mu$ M原液至400 nM之最終濃度之TQ.8v6.1.F、TQ.8v6.1.R、轉化酶F及轉化酶R引物；各0.4  $\mu$ l的來自5  $\mu$ M原液至200 nM之最終濃度之TQ.8v6.1.MGB.P及轉化酶探針、0.1  $\mu$ l之至0.1%最終濃度之10%聚乙烯吡咯啉酮(PVP)；2  $\mu$ l 10 ng/ $\mu$ l基因組DNA及0.5  $\mu$ l水。於Roche LightCycler<sup>®</sup> 480系統中在以下條件擴增DNA：95 $^{\circ}$ C 10 min 1個循環；以下3個步驟40個循環：95 $^{\circ}$ C 10秒；58 $^{\circ}$ C 35秒及72 $^{\circ}$ C 1秒，及最後一個循環為4 $^{\circ}$ C 10秒。藉由將未知樣本(藉由LightCycler<sup>®</sup> 480輸出)之標靶(受關注基因)/參考(轉化酶基因)值與*cry34Ab1*複本數對照之標靶/參考值進行比較來測定*Cry34Ab1*複本數。

如上針對*cry34Ab1*基因所述使用轉化酶內源參考基因進行*aad-1*基因之偵測。*aad-1*引物序列如下；

AAD1正向引物：TGTTCGGTTCCTCTACCAA (SEQ ID NO:12)

AAD1反向引物：CAACATCCATCACCTTGACTGA (SEQ ID  
NO:13)

AAD1 探針：5'-FAM/CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA-MGB/BHQ-3' (SEQ ID NO:14)

最終，在V4-5採集包含受關注基因之T<sub>0</sub>植物樣本以進行*cry34Ab1*及*AAD-1*葉ELISA分析。採集四個葉片樣本。針對整根塊在V4-5採集另一組植物樣本以用於兩個蛋白質ELISA分析。按照製造商說明書進行葉及根Cry34Ab1(Agdia, Inc., Elkart, IN)及AAD1(Acadia BioScience) ELISA分析。該等Cry34Ab1葉ELISA分析以ng/cm<sup>2</sup>表示，而根ELISA結果以百萬分率(或ng蛋白質/mg總植物蛋白質)表示。利用Bradford偵測法按照製造商說明書進行總根蛋白質分析。

T<sub>0</sub>植物經自交並與玉米c.v. B104非轉殖基因轉形株雜交以獲得T<sub>1</sub>種子。各測試調控元件構築體之5至6個轉殖基因株或品系係經改良以供T<sub>1</sub>蛋白質研究。因此，播種各品系之30至40顆T<sub>1</sub>種子；在發育的V2-3階段對幼苗噴灑SureII<sup>®</sup>以殺死非轉殖基因離析物。

#### 實例5：蛋白質積聚之分子驗證

接著，在植物發育的多個階段採集轉殖基因植物樣本以供如下之Cry34Ab1(Agdia, Inc.；目錄號04500/4800)及AAD-1(Envirologix；目錄號11638) ELISA：葉(V4、V12及R3)及根(V6)。分離所有組織並置於嵌入乾冰中之管內；接著將其轉移至-80°C。在蛋白質提取前凍乾除葉外之冷凍組織以用於ELISA。

在V4、V12及R3採集包含*cry34Ab1*及*aad-1*轉殖基因之推定轉殖基因T<sub>1</sub>植物樣本以進行葉ELISA分析。採集四個葉片樣本。將該等葉片置於管中及將一個1/8"不鏽鋼珠(Hoover Precision Products, Cumming, GA, USA)添加至每個1.2 ml的裝納300 µl提取緩衝液(補充0.05% Tween 20及0.5% BSA之1X PBST)之管。在Genogrinder™(SPEX SamplePrep, Metuchen, NJ)中以1,500 rpm處理該等樣本4分鐘。在Sorvall Legend XFR™離心機中以4,000 rpm離心該等樣本2分鐘。接

著，另添加300 µl提取緩衝液及在Genogrinder™中以1,500 rpm再一次處理該等樣本2分鐘。以4,000 rpm再一次離心該等樣本7分鐘。最後，收集上清液及使用市售Cry34Ab1(Agdia, Inc.)及AAD-1(Acadia BioScience, LLC) ELISA分析套組，按照製造商說明書，在不同稀釋下連同蛋白質標準品完成ELISA分析。藉由在油漆搖晃器中於存在八個0.25”陶瓷珠(MP Biomedicals, USA, 目錄號6540-422)下研磨凍乾組織30秒進行針對各種組織類型ELISA之蛋白質提取。就需要進一步研磨之組織而言，再重複研磨步驟30秒。將石榴石粉添加於2 ml管中以覆蓋管底部之彎曲部分。將經粗研磨之組織轉移至2 ml管並填充至0.5 ml標記。添加一個陶瓷球至各管，正如0.6 ml部分提取緩衝液(200 µl 蛋白酶抑制劑混合物、200 µl 500 mM EDTA、15.5 mg DTT粉及至20 ml之PBST)。將所有該等管保持於冰上10分鐘。將該等冷的管轉移至Genogrinder®之2 ml固定架。研磨該等樣本兩次45秒。接著，將40 µl 10% Tween®-20及300 µl提取緩衝液添加至該等樣本。再研磨該等樣本45秒，中間冷卻5分鐘。最後，以13,000 rpm離心各樣本7分鐘，及將上清液小心地轉移至新管以收集提取物。按ELISA分析葉組織所需稀釋該提取物。其他植物組織採用相似的分析。

實例6：作物中可以操作方式與阿拉伯芥泛素C9調控元件連接之基因之表現圖譜

如pDAB122807中所提供，SEQ ID NO:1之阿拉伯芥泛素C9 3' UTR調控元件導致玉米轉殖基因品系中*cry34Ab1*基因之組成性表現。表1匯總各種組織類型中及不同發育階段下*cry34Ab1*基因之穩健表現。經陰性對照構築體pDAB101556轉形之植物品系中幾乎沒有觀察到或偵測到Cry34Ab1葉表現。該構築體pDAB101556不包含*cry34Ab1*轉殖基因。在所分析之組織中，所有構築體表現*aad-1*基因。

表1.由在各種類型之玉米組織中轉殖基因之表現所得到的描繪Cry34Ab1及AAD-1蛋白質含量之ELISA結果。自T1轉殖基因植物之所述組織類型獲得所指示樣本。

構築體名稱	組織類型	取樣的總品系數	總植物數	Cry34Ab1平均值 (ng/mg)	Cry34Ab1 STD	AAD-1平均值 (ng/mg)	AAD-1 STD
pDAB101556	葉V4	1	9	1	4	79	71
pDAB122807	葉V4	5	51	1437	219	467	249
pDAB101556	葉V12	1	5	2	3	909	140
pDAB122807	葉V12	5	24	1009	123	1516	239
pDAB101556	葉R3	1	5	4	6	969	322
pDAB122807	葉R3	5	24	2954	420	2178	633
pDAB101556	V6根	1	3	0	0	4018	386
pDAB122807	V6根	3	9	1619	419	7795	1809

因此，識別並表徵新穎的阿拉伯芥泛素C9 3' UTR基因調控元件 (SEQ ID NO:1)。首次揭示的是用於基因表現構築體之新穎的3'UTR調控元件。

實例7：可以操作方式與阿拉伯芥泛素C9 3' UTR連接之基因之農桿菌介導之轉形

可利用可以操作方式與阿拉伯芥泛素C9 3' UTR連接之基因，藉由採用先前述於專利申請案WO 2007/053482之實例#11或實例#13中之相同技術，轉形大豆。

可利用可以操作方式與阿拉伯芥泛素C9 3' UTR連接之基因，藉由採用先前述於美國專利第7,838,733號之實例#14或專利申請案WO 2007/053482(Wright等人)之實例#12中之相同技術，轉形棉花。

可利用可以操作方式與阿拉伯芥泛素C9 3' UTR連接之基因，藉由採用先前述於美國專利第7,838,733號之實例#26或專利申請案WO 2007/053482(Wright等人)之實例#22中之相同技術，轉形芥花菜。

可利用可以操作方式與阿拉伯芥泛素C9 3' UTR連接之基因，藉由採用先前述於專利申請案WO 2013/116700A1(Lira等人)之實例#23

中之相同技術，轉形小麥。

可利用可以操作方式與阿拉伯芥泛素C9 3' UTR連接之基因，藉由採用先前述於專利申請案WO 2013/116700A1(Lira等人)之實例#19中之相同技術，轉形稻米。

實例8：可以操作方式與阿拉伯芥泛素C9調控元件連接之基因之農桿菌介導之轉形

根據本發明，可根據本發明之實施例，採用此項技術中已知的技術轉形其他作物。關於黑麥之農桿菌介導之轉形，參見，例如，Popelka JC、Xu J、Altpeter F.，「Generation of rye with low transgene copy number after biolistic gene transfer and production of (*Secale cereale* L.) plants instantly marker-free transgenic rye」，*Transgenic Res.* 2003年10月；12(5):587-96)。關於蜀黍之農桿菌介導之轉形，參見，例如，Zhao 等人，「*Agrobacterium*-mediated sorghum transformation」，*Plant Mol Biol.* 2000年12月；44(6):789-98。關於大麥之農桿菌介導之轉形，參見，例如，Tingay等人，「*Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation」，*The Plant Journal*, (1997) 11:1369-1376。關於小麥之農桿菌介導之轉形，參見，例如，Cheng 等人，「Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*」，*Plant Physiol.* 1997年11月；115(3):971-980。關於稻米之農桿菌介導之轉形，參見，例如，Hiei 等人，「Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*,」*Plant Mol. Biol.* 1997年9月；35(1-2):205-18。

下文提供該等及其他植物之拉丁名。應明瞭，其他(非農桿菌)轉形技術可用於轉形可以操作方式與阿拉伯芥泛素C9之3' UTR連接之基因，例如，轉形至該等及其他植物中。實例包括，但不限於；玉米(玉米(*Zea mays*))、小麥(小麥屬(*Triticum spp.*))、稻米(稻屬(*Oryza*

*spp.*)及菰屬(*Zizania spp.*)、大麥(大麥屬(*Hordeum spp.*))、棉花(昂天蓮(*Abroma augusta*)及陸地棉(*Gossypium spp.*))、大豆(大豆(*Glycine max*))、糖甜菜及鮮食甜菜(甜菜屬(*Beta spp.*))、甘蔗(秀貴甘蔗(*Saccharum officinarum*))、番茄(番茄屬及其他品種、黏果酸醬(*Physalis ixocarpa*)、黃水茄(*Solanum incanum*)及其他品種、及樹番茄(*Cyphomandra betacea*))、馬鈴薯(馬鈴薯(*Solanum tuberosum*))、番薯(甘薯(*Ipomoea batatas*))、黑麥(裸麥屬(*Secale spp.*))、辣椒(辣椒(*Capsicum annum*))、中華辣椒(*Capsicum chinense*)及紫麻(*frutescens*))、萵苣(萵苣(*Lactuca sativa*)、水丁香(*Lactuca perennis*)及美藍葉藤(*Lactuca pulchella*))、捲心菜(蕓薹屬(*Brassica spp.*))、芹菜(旱芹(*Apium graveolens*))、茄子(茄(*Solanum melongena*))、花生(落花生(*Arachis hypogea*))、蜀黍(蜀黍屬(*Sorghum spp.*))、苜蓿(紫花苜蓿(*Medicago sativa*))、胡蘿蔔(胡蘿蔔(*Daucus carota*))、豆(菜豆屬(*Phaseolus spp.*)及其他屬)、燕麥(雀麥(*Avena sativa*)及臘蓮繡球(*Avena strigosa*))、豌豆(豌豆屬(*Pisum*))、豇豆屬(*Vigna*)及四棱豆屬(*Tetragonolobus spp.*))、向日葵(太陽花(*Helianthus annuus*))、南瓜(南瓜屬(*Cucurbita spp.*))、黃瓜(黃瓜屬(*Cucumis sativa*))、菸草(菸草屬(*Nicotiana spp.*))、芥菜屬(阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*))、草坪草(黑麥草屬(*Lolium*))、剪股穎屬(*Agrostis*))、早熟禾(*Poa*)、狗牙根屬(*Cynodon*)及其他屬)、丁香(三葉草屬(*Trifolium*))、野豌豆(豌豆屬(*Vicia*))。本發明之實施例中設想此等植物藉由可以操作方式與例如阿拉伯芥泛素C9之3' UTR連接之基因之轉形。

使用阿拉伯芥泛素C9之3' UTR以終止可以操作方式連接之基因，可於許多落葉及常綠木材物種中展開。此等應用亦在本發明實施例之範疇內。該等物種包括，但不限於；赤楊木(赤楊屬(*Alnus spp.*))、樺木(樺屬(*Fraxinus spp.*))、山楊及白楊物種(楊樹屬(*Populus*

*spp.*)、山毛櫸(山毛櫸屬(*Fagus spp.*))、樺樹(毛樺屬(*Betula spp.*))、櫻桃(櫻桃屬(*Prunus spp.*))、桉樹(桉屬(*Eucalyptus spp.*))、山核桃(山核桃屬(*Carya spp.*))、楓樹(楓屬(*Acer spp.*))、櫟木(櫟屬(*Quercus spp.*))及松(松屬(*Pinus spp.*))。

使用阿拉伯芥泛素C9之3' UTR以終止可以操作方式連接之基因，可於觀賞性及結果物種中展開。此等應用亦在本發明實施例之範疇內。實例包括，但不限於；玫瑰(薔薇屬(*Rosa spp.*))、荊棘(衛矛屬(*Euonymus spp.*))、矮牽牛(矮牽牛屬(*Petunia spp.*))、秋海棠(秋海棠屬(*Begonia spp.*))、杜鵑花(杜鵑花屬(*Rhododendron spp.*))、紅果或蘋果(海棠屬(*Malus spp.*))、梨(梨屬(*Pyrus spp.*))、桃(桃屬(*Prunus spp.*))及萬壽菊(萬壽菊屬(*Tagetes spp.*))。

雖然上文已論述許多例示性態樣及實施例，但熟習此項技術者將明白某些修改、排列、新增及其子組合。因此希望隨後的以下隨附申請專利範圍及其後所引用之申請專利範圍應解釋為包括所有此等在其真實精神及範疇內之修改、排列、新增及子組合。

#### 【符號說明】

無

## 【序列表】

<110> 美商道禮責任有限公司

曼朱 古波塔

莎拉 班尼特

安德魯 華登

<120> 用於轉殖基因表現之植物啟動子及 3' UTR

<130> DAS: 78149-US-PSP

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 664

<212> DNA

<213> 阿拉伯芥

<400> 1

```

acaaatactg tccttaagga agagccctaa taattaaact cttcttatti ctatgtaatg      60
atcttttata gactigtctg tcttataaaa ttigtgaaga caggatcagt aagaaattat      120
ttgatctcca ttctatggaa ttgtaaaacg taaatcatca tcccgctctgc tgtttcttta      180
ttgcgtgatg ccgatgcgtc tctgtgttta tcaaggctca tattatfttg gattttattc      240
tgtccaaagc ccaaactagc tacaatcgta agcctttccg ttttcgtaaa cattattaac      300
ttacatacgt aacattttca ttttagtatt atgtgggcaa tgatttatgt aaatgggtgta      360
tggggcctaa gagtgaagtt gttcatgagt taagattgtg attgtgatcc atctggaaca      420
atttaataaa atgggacaaa ggaattatca ctttgaagtt tgaccaattt aagatttaca      480
aaaaatagta aaactattaa aatcaccttt tcccacaata atatactcaa acgggtttag      540
ccattagtgc tactaaacat tatggtataa agacctgaa aaaacggtta cttttttatg      600
gtataacca actattatga cacttttgtg ttcaaggttc tglttcagtg atggagtata      660
gtat      664

```

<210> 2

<211> 517

<212> DNA

<213> 木薯葉脈花葉病毒

<400> 2

```

ccagaaggtg attatccaag atgtagcadc aagaatccaa tgtttacggg aaaaactatg      60
gaagtattat gtgagctcag caagaagcag atcaatatgc ggcacatag caacctatgt      120
tcaaaaatga agaatgtaca gatacaagat cctatactgc cagaatacga agaagaatac      180
gtagaaattg aaaaagaaga accaggcgaa gaaaagaatc ttgaagacgt aagcactgac      240
gacaacaatg aaaagaagaa gataaggctc gtgatttga aagagacata gaggacacat      300
gtaagggtgga aatgtaagg gcggaaagta accttatcac aaaggaatct tatccccac      360
tacttatect ttttatatftt tccgtgtcat ttttgcctt gagttttcct atataaggaa      420
ccaagttcgg cttttgtgaa aacaagaaaa aatttgggtg aagctatftt ctttgaagta      480

```

ctgaggatac aacttcagag aaatttgtaa gtttgta 517

<210> 3  
 <211> 1586  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 包含 CsVMV 啟動子、cry34Ab1 編碼序列及 At Ubi C9 3' UTR 之基因表現盒

<400> 3  
 ccagaaggta attatccaag atgtagcatic aagaatccaa tgtttacggg aaaaactatg 60  
 gaagtattat gtgagctcag caagaagcag atcaatatgc ggcacatatg caacctatgt 120  
 tcaaaaatga agaattgtaca gatacaagat cctatactgc cagaatacga agaagaatac 180  
 gtagaaattg aaaaagaaga accaggcgaa gaaaagaatc ttgaagacgt aagcactgac 240  
 gacaacaatg aaaagaagaa gataaggctc gtgattgtga aagagacata gaggacacat 300  
 gtaagggtga aaatgtaagg gcggaaagta accttatcac aaaggaatct tatccccac 360  
 tacttatect tttatatttt tccgtgtcat tttgcccctt gagttttcct atataaggaa 420  
 ccaagttcgg catttgfgaa aacaagaaaa aatttggtgt aagctatttt cttgaagta 480  
 ctgaggatac aacttcagag aaatttgtaa gtttgtaacca gaagacacca tgtccgcccg 540  
 cgagggtcac atcgacgtga acaacaagac cggccacacc ctccagctgg aggacaagac 600  
 caagctcgac ggcggcaggt ggcgcacctc cccgaccaac gtggccaacg accagatcaa 660  
 gaccttcgtg gccgaatcca acggcttcat gaccggcacc gagggcacca tctactactc 720  
 catcaacggc gaggccgaga tcagccteta citegacaac ccgttcgccc gctccaacaa 780  
 atacgacggc cactccaaca agtcccagta cgagatcatic acccagggcg gctccggcaa 840  
 ccagtccac gtgacctaca ccatccagac caectcctcc cgctacggcc acaagtctg 900  
 agtagttagc ttaatcacct agacaaatac tgtccttaag gaagagocct aataaitaaa 960  
 ctctctttat ttctatgtaa tgatctttta tagacttgc tctcttataa aatttgtaa 1020  
 gacaggatca gtaagaaatt atttgatctc cattctatgg aattgtaaaa cgtaaatcat 1080  
 catcccgctt gctgtttctt tattgcgtga tgccgatgcg tctctgtggt tatcaaggct 1140  
 catattattt tggattttat tctgtccaaa gcccaacta gctacaatcg taagcctttc 1200  
 cgttttcgta aacattatia acttacatac gtaacatttt catttagta ttatgtgggc 1260  
 aatgatttat gtaaattggg tatggggcct aagagtgaag ttgttcatga gtttaagattg 1320  
 tgattgtgat ccatctggaa caatttaata aaatgggaca aaggaattat cactttgaag 1380  
 tttgaccaat ttaagattta caaaaaatag taaaactatt aaaatcacct tttccccaaa 1440  
 taatatactc aaacgggttt agccattagt gctactaac attatggtat aaagaccttg 1500  
 aaaaaacggg tactttttta tggfataacc caactattat gacacttttg tgttcaaggt 1560  
 tctgtttcag tgatggagta tagtat 1586

<210> 4  
 <211> 3307  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 包含 Zm Ubi1 啟動子、aad-1 編碼序列及 Zm 脂酶 3' UTR 之基因表現盒

<400> 4  
 gtgcagcgtg acccggcgtg gccctctct agagataatg agcattgcat gtctaagtta 60  
 taaaaaatta ccacatattt ttttgtcac actigtgtga agtgcagttt atctatcttt 120  
 atacatata ttaaacttta ctctacgaat aatataatct atagtactac aataatatca 180  
 gtgttttaga gaatcatataaatgaacagt tagacatggt ctaaaggaca attgagtatt 240  
 ttgacaacag gactctacag ttttatcttt ttagtgtgca tgtgttcctc ttttttttg 300  
 caaatagctt cacctatata atacttcac cattttatta gtacatccat ttagggttta 360  
 gggtaaatgg ttttataga ctaatTTTT tagtacatct attttatct attttagcct 420  
 ctaaatfaag aaaactaaaa ctctatTTTA gttttttat ttaatagttt agatataaaa 480  
 tagaataaaa taaagtgact aaaattaaa caaataccct ttaagaaatt aaaaaacta 540  
 aggaaacatt tttctgttt cgagtagata atgccagcct gttaaacgcc gtcgacgagt 600  
 ctaacggaca ccaaccagcg aaccagcagc gtcgctcgg gccaaagcga gcagacggca 660  
 cggcatctct gtcgctgcct ctggaccct ctgagagtt ccgctccacc gttggacttg 720  
 ctccgctgic ggcatccaga aattgcgtgg cggagcggca gacgtgagcc ggcacggcag 780  
 gcggcctcct cctcctctca cggcaaccggc agctacgggg gattccttc ccaccgctcc 840  
 ttgctttcc ctctctgcc cggcgttaata aatagacacc cctccacac cctcttccc 900  
 caacctcgtg ttgtcggag cgcacacaca cacaaccaga tctccccaa atccaccgt 960  
 cggcacctcc gttcaaggt acgccgctc tctcccccc cccccccct ctctacctc 1020  
 tctagatcgg cgtccggtc catgcatggt tagggcccgg tagttctact tctgttcatg 1080  
 tttgttttag atccgtgttt gtgttagatc cgigtgcta gcgttcgtac accgatgca 1140  
 cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa ctggcagtg tttctcttg gggaatcctg 1200  
 ggatggctct agccgttccg cagacgggat cgatttcag atttttttg tttcgttgca 1260  
 tagggtttgg ttgcccttt tctttattt caatatatgc cgtgcacttg tttgtcgggt 1320  
 catcttttca tgcTTTTTT tgtcttggtt gtgatgatgt ggtctggttg ggcggtcgtt 1380  
 ctagatcgga gtagaattct gttcaaact acctggtgga tttattaatt ttggatctgt 1440  
 atgtgtgtgc catacatatt catagttacg aattgaagat gatggatgga aatatcgatc 1500  
 taggataggt atacatgttg atcgggttt tactgatgca tatacagaga tgcTTTTgt 1560  
 tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtggttg ggcggtcgtt cattcgttct agatcggagt 1620  
 agaatactgt tcaaactac ctgggtatt tattaattt ggaactgtat gtgtgtgca 1680

tacatctica tagttacgag tttaaagatgg atggaaafat cgaictagga taggtataca 1740  
 tgttgaigtg ggtttfactg atgcatatac atgatggcat atgcagcatc tattcatatg 1800  
 ctetaacctt gagtacctat ctattataat aaacaagtat gttttataat tatttcgatc 1860  
 ttgatatact tggatgatgg catatgcagc agctatatgt ggattttttt agccctgcct 1920  
 tcataccta tttatttggct tggfactgtt tctttigtcg atgctcacc cgtttgtttgg 1980  
 tgttacttct gcaggtacag tagttagttg aggtaccgga tccacacgac accatggctc 2040  
 atgctgccct cagccctctc tcccaacgct ttgagagaat agctgtccag ccaactcactg 2100  
 gtgtccttgg tgetgagatc actggagtggt acttgaggga accacttgat gacagcacct 2160  
 ggaatgagat attggatgcc ttccacactt accaagtcac ctactttcct ggccaagcaa 2220  
 tcaccaatga gcagcacatt gcattctcaa gaaggtttgg accagttgat ccagtgccctc 2280  
 ttctcaagag cattgaaggc tatccagagg ttcatatgat ccgcagagaa gccaatgagt 2340  
 ctggaagggt gattggatg gactggcaca cagactccac ttcccttgat gcacctccag 2400  
 ctgctgttgt gatgagggcc atagatgttc ctgagcatgg cggagacact gggttccttt 2460  
 caatgtacac agcttgggag acctgtctc caacctgca agccaccatc gaagggtcga 2520  
 acgtttgtca ctctgccaca cgtgtgttcg gtccccicta ccaagcacag aaccgtcgtc 2580  
 tcagcaacac ctcagtcaag gtgatggatg ttgatgctgg tgacagagag acagtccatc 2640  
 ccttgggtgt gactcatcct ggctctggaa ggaaaggcct ttatgtgaat caagtctact 2700  
 gtcagagaat tgagggcatg acagatgcag aatcaaagcc attgcttcag ttctctatg 2760  
 agcatgccac cagatttgac ttcacttgc gtgtgaggtg gaagaaagac caagtccttg 2820  
 tcitgggaaa ctigtgcacc atgcaccgtg ctgttctga ctatgctggc aagttcagat 2880  
 acttgactcg caccacagtt ggtggagtta ggccctgccg ctgagtagtt agcttaatca 2940  
 cctagagctc ggtcgcagcg tgtgcgtgc cgtcgtactt tctggccggc cgggccttgg 3000  
 gcgcgcgac agaagcgttg cgttggcgtg tgtgtgcttc tggtttgcct taattttacc 3060  
 aagtttgttt caaggtggat cgcgtgttca agcccgtgt gctttaaaga cccaccggca 3120  
 ctggcagtga gtgttgcctc ttgtgtaggc tttggfacgt atggccttfa tttgcttctg 3180  
 gatgttgtgt actacttggg tttgttgaat tattatgagc agttgcgtat tgaattcag 3240  
 ctgggctacc tggacattgt tatgtattaa taaatgcttt gctttcttct aaagatcttt 3300  
 aagtgt 3307

<210> 5  
 <211> 447  
 <212> DNA  
 <213> 阿拉伯芥

<400> 5  
 atggcatcga aacggatttt gaaggaattg aaggatctgc agaaggatcc tctacttca 60  
 tgtagcgcag gacccttgc ggaagacatg ttcatatggc aggccactat aatgggtcca 120

tcggatagcc cttattctgg aggagttttt cttgtaacca tccatttccc tccagattac 180  
 ccattttaagc ctccctaagg ggcttttagg acgaagggtg tccatccaaa cattaacagc 240  
 aatggaagca tctgcctcga catcttgaag gagcagtgga gtctgtctct cacaatttcc 300  
 aagggtgctgc tatcgatctg ttctttgta acggatccaa acccagaatga tcctttggtc 360  
 cctgagatag ctcacatgta caagacagac aagaacaagt acgagtccac tgctcggacc 420  
 tggacccaaa agtatgcat gggctga 447

<210> 6  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 正向引物：TQ.8v6.1.F

<400> 6  
 gccataccct ccagttg 17

<210> 7  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 反向引物：TQ.8V6.1.R

<400> 7  
 gccgttgatg gagtagtaga tgg 23

<210> 8  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 探針：TQ.8v6.1.MGB.P

<400> 8  
 ccgaatccaa cggttca 18

<210> 9  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 正向引物：轉化酶 F

<400> 9  
 tggcggacga cgacttgt 18

<210> 10  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 反向引物：轉化酶 R  
 <400> 10  
 aaagtttggg ggctgccgt 19

<210> 11  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 轉化酶探針  
 <400> 11  
 cgagcagacc gccgtgtact t 21

<210> 12  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> AAD1 正向引物  
 <400> 12  
 tgttcggttc cctctaccaa 20

<210> 13  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> AAD1 反向引物  
 <400> 13  
 caacatccat caccttgact ga 22

<210> 14  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> AAD1 探針  
 <400> 14  
 cacagaaccg tcgcttcagc aaca 24

201718862

## 發明摘要

※ 申請案號：105175967

※ 申請日：105. 8. 15

※IPC 分類：C12N 15/66 (2006.01)  
C12N 15/82 (2006.01)

## 【發明名稱】

用於轉殖基因表現之植物啟動子及3'UTR

PLANT PROMOTER AND 3' UTR FOR TRANSGENE

EXPRESSION

## 【中文】

本發明係關於用於促進植物或植物細胞中核苷酸序列之轉錄及轉譯之組合物及方法，其利用來自阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)泛素C9基因之3'UTR。一些實施例係關於來自阿拉伯芥泛素C9基因之3'UTR，其在植物中功能為終止可以操作方式連接的核苷酸序列之轉錄。

## 【英文】

This disclosure concerns compositions and methods for promoting transcription and translation of a nucleotide sequence in a plant or plant cell, employing a 3'UTR from *Arabidopsis thaliana* Ubiquitin C9 gene. Some embodiments relate to a 3' UTR from a *Arabidopsis thaliana* Ubiquitin C9 gene that functions in plants to terminate transcription of operably linked nucleotide sequences.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（ 1 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

無

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

無

## 申請專利範圍

1. 一種核酸載體，其包含可以操作方式與以下連接之3' UTR：
  - a) 多連接子序列；
  - b) 非阿拉伯芥(*non-Arabidopsis thaliana*)泛素C9基因；或
  - c) a)與b)之組合，其中該3' UTR包含與SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性之多核苷酸序列。
2. 如請求項1之核酸載體，其中該3' UTR長度為664 bp。
3. 如請求項1之核酸載體，其中該3' UTR係由與SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性之多核苷酸序列組成。
4. 如請求項1至3中任一項之核酸載體，其進一步包含編碼可選擇標誌之序列。
5. 如請求項1之核酸載體，其中該3' UTR係可以操作方式與轉殖基因連接。
6. 如請求項5之核酸載體，其中該轉殖基因編碼賦予殺昆蟲劑抗性、除草劑耐受性、RNAi之表現、氮利用效率、水利用效率或營養品質之可選擇標誌或基因產物。
7. 如請求項1至3或5中任一項之核酸載體，其進一步包含與SEQ ID NO:2具有至少90%序列同一性之啟動子多核苷酸序列，其中該啟動子序列係可以操作方式與該多連接子或該轉殖基因連接。
8. 如請求項1至3或5中任一項之核酸載體，其進一步包含內含子序列。
9. 如請求項1之核酸載體，其中該3'UTR具有組成性或組織特異性表現。
10. 一種產生轉殖基因植物之方法，其包括以下步驟：
  - a) 以可以操作方式與轉殖基因連接之包含與SEQ ID NO:1具

有至少90%序列同一性之多核苷酸序列的基因表現盒轉形植物細胞；

b) 分離包含該基因表現盒之該轉形植物細胞；及，

c) 使該轉形植物細胞再生成為轉殖基因植物。

11. 如請求項10之方法，其中該轉殖基因植物係選自由玉米、小麥、稻米、蜀黍、燕麥、黑麥、香蕉、甘蔗、大豆、棉花、阿拉伯芥(*Arabidopsis*)、菸草、向日葵及芥花菜(*canola*)組成之群。
12. 如請求項10之方法，其中該轉殖基因植物為玉米(*Zea mays*)。
13. 如請求項10至12中任一項之方法，其中該轉殖基因係插入至該轉殖基因植物之基因組中。
14. 如請求項10之方法，其中該基因表現盒包含包含與SEQ ID NO:1具有至少90%序列同一性之多核苷酸序列之3' UTR，且該3' UTR長度為664 bp。
15. 如請求項14之方法，其中該基因表現盒包含包含SEQ ID NO:2之啟動子序列，其中該啟動子序列係可以操作方式與該轉殖基因連接
16. 如請求項15之方法，其中該轉殖基因具有組成性或組織特異性表現。
17. 如請求項15之方法，其中該啟動子為阿拉伯芥泛素C9啟動子。
18. 一種產生轉殖基因種子之方法，該方法包括以下步驟：
  - a) 培養由如請求項10至17中任一項之方法產生之轉殖基因植物；及
  - b) 自該轉殖基因植物獲得轉殖基因種子。
19. 一種產生轉殖基因植物細胞之方法，該方法包括以下步驟：
  - a) 以包含可以操作方式與至少一個受關注多核苷酸序列連接之

阿拉伯芥泛素C9 3'UTR的基因表現盒轉形植物細胞；

b) 分離包含該基因表現盒之該轉形植物細胞；及，

c) 產生包含可以操作方式與至少一個受關注多核苷酸序列連接之阿拉伯芥泛素C9 3'UTR之轉殖基因植物細胞。

20. 如請求項19之方法，其中植物細胞之轉形係利用植物轉形方法來進行。

21. 如請求項19之方法，其中該受關注多核苷酸序列係穩定地整合至該轉殖基因植物細胞之基因組中。

22. 如請求項19之方法，該方法進一步包括以下步驟：

d) 使該轉殖基因植物細胞再生成為轉殖基因植物；及，

e) 獲得該轉殖基因植物，其中該轉殖基因植物包含包含如請求項1之可以操作方式與至少一個受關注多核苷酸序列連接之阿拉伯芥泛素C9 3'UTR之基因表現盒。

23. 如請求項19之方法，其中該阿拉伯芥泛素C9 3'UTR包含SEQ ID NO:1之多核苷酸。

24. 一種經分離的多核苷酸，其包含與SEQ ID NO:1之多核苷酸具有至少90%序列同一性之核酸序列。

25. 如請求項24之經分離的多核苷酸，其進一步包含編碼多肽之開放閱讀框多核苷酸；及啟動子序列。

26. 如請求項24之經分離的多核苷酸，其中該SEQ ID NO:1之多核苷酸長度為664 bp。

圖式

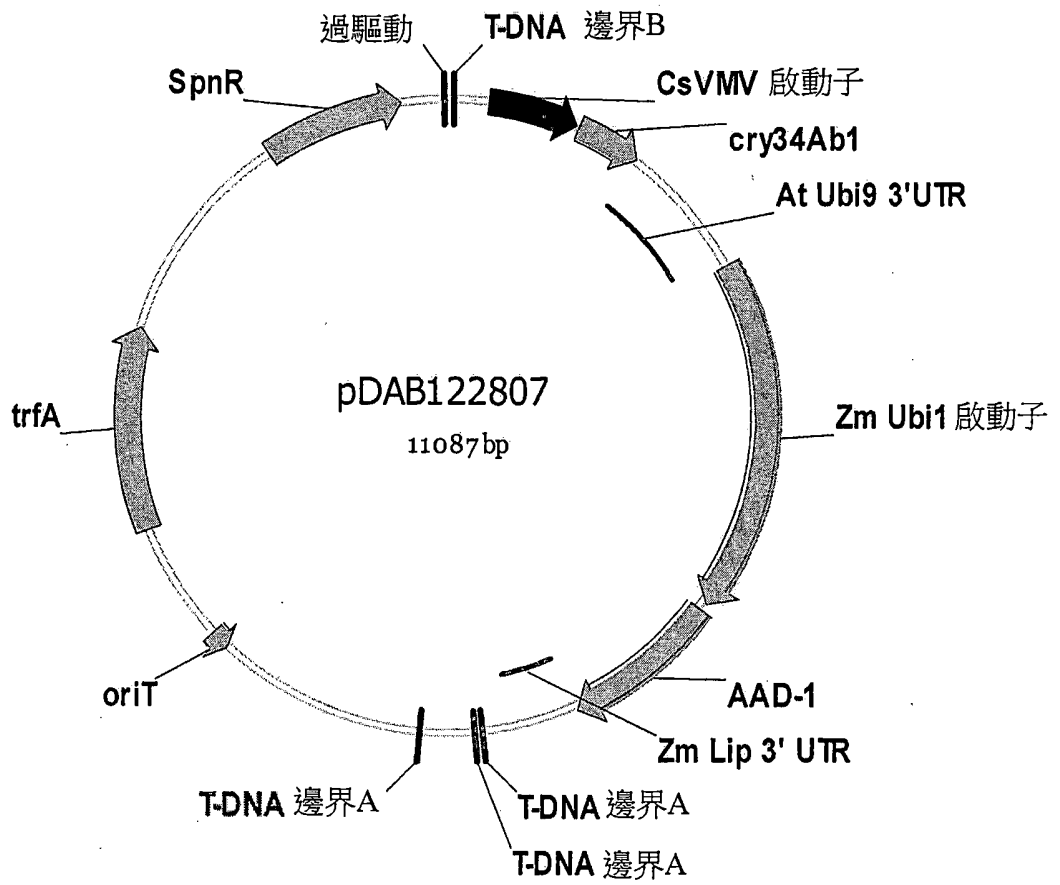


圖 1