



УКРАЇНА

(19) **UA**(11) **124253**(13) **C2**

(51) МПК

C12N 15/67 (2006.01)**C12N 15/113** (2010.01)**C12N 15/82** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2017 01736	(72) Винахідник(и): Дін Скот (US), ван Аллен Мішель (US), Лу Алберт (US)
(22) Дата подання заявки: 30.07.2015	(73) Володілець (володільці): ПІОНІР ХАЙ-БРЕД ІНТЕРНЕТНЛ, ІНК., 7100 N.W. 62nd Avenue, Johnston, Iowa 50131-1014, United States of America (US), Е. І. ДЮ ПОН ДЕ НЕМУРС ЕНД КОМПАНІ, Chestnut Run Plaza, 974 Centre Road, P. O. Box 2915, Wilmington, Delaware 19805, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 19.08.2021	(74) Представник: Олішевич Людмила Анатоліївна, реєстр. №194
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції: 62/034,970	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2012/088227 A1, 28.06.2012 "Lamium leaf distortion associated virus, complete genome.", EMBL, 09.04.2008, номер запису у базі даних EU554423 Livia Stavalone et al, "Cestrum yellow leaf curling virus (CmYLCV) promoter: a new strong constitutive promoter for heterologous gene expression in a wide variety of crops", Plant Molecular Biology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, 01.11.2003, vol. 53, no. 5, P. 703 - 713
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції: 08.08.2014	
(33) Код держави-учасниці Парижської конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.05.2017, Бюл.№ 9	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 18.08.2021, Бюл.№ 33	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2015/042842, 30.07.2015	

(54) ПРОМОТОРНИЙ ЕЛЕМЕНТ РОСЛИН ТА РОСЛИНА, ЩО МІСТИТЬ ЙОГО**(57) Реферат:**

Винахід стосується ДНК-конструкції, яка містить промотор та гетерологічну молекулу полінуклеотиду, що транскрибується, функціонально пов'язану з промотором. Винахід також стосується трансгенної рослини або клітини рослини, стабільно трансформованої ДНК-конструкцією та насінини трансгенної рослини, яка містить вказану ДНК-конструкцію.

UA 124253 C2

cctacggtttttaaggattattatgtttgtttttaatgggtcctcttccaggtatctataccaattggcctgc

LLDAV TR1 1130 n. o.

agcacagcaagctacgaagaatgtttggaatgtttctacacaagaatacaaaaggcttcatagaagcaaga
acggcggcagattttatactgcacaaaatcatgggttagaacctctcaagttctattctgaagaagctactc
ttcaaccccaagcagcctaaaagaaaaagttccatccggcgaactaccagctcttctctcaagaagctga

LLDAV TR2 904 n. o.

LLDAV TR3 885 n. o.

tacaccagatgtaaacattgtcatggaagacttcatgaatgtttacaaggctgcaagagcttattaagat
gaacgattcttcatcgaccacttcttccaccacgagaagaaaaatctaagcttttacaatttctgtgaat
gttcagatcctgagatcgtataaagatgcctatctttgtggattgatcaaaacaatctaccaggtcctaa
tctcttggagattttctctccttccataaagagataagaagaaatgtcaagctattcagacgaaagtgcatt
aaagatccaagtaagaaaaatttacttgaaattctccagcactattccagatggggaaaaagaagggtgaac
agggttactggccacatcaccatataactatgggtgtttcgttcgaagaagaacaataccagccttccag
acaaatggaagccacacttgagggtcaagaccttgaagaactagctgttcaaaaaattcaacagttcctc

LLDAV TR4 443 n. o.

gaaaagatgtttgaattcagcaaggaagattagacttttgtcaatcttatctggaataggyttttgataa
cttcaaaaatctttcaaaaccactcagcacaaagccatgtgggaattgattcttctttttcaaaagaggttaaa
gaatcattatgactttggaccccaccatccactcataatgcaaaagcatagagaaaaagtcagtggaatac
agctgcctcaactgttagcaaaaggcaaaaggccaaagaaagacggacacgtagaagattctgcgacaacgt

LLDAV TR5 113 n. o.

cgtcatcatccagctaattgtagttagtggttgattcgtcagcaatgacgtaaaaacatttgatcgatcct
cactccttatctataaaaagggttgagttattttcttgggaaggacatctcgaaactagcagtcctctcctt
tcaaaaaatttatctttttaagtttttagtcgtcgt

ПОСИЛАННЯ НА ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕНИЙ В ЕЛЕКТРОННОМУ ВИГЛЯДІ

Перелік послідовностей з назвою файла "5970P_Sequence_Listing.TXT", створений 18 липня 2014 року, та розміром 7,4 кілобайти подається у машиночитальній формі одночасно з даним описом. Перелік послідовностей є частиною даного опису та включений у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

Дане розкриття відноситься до галузі молекулярної біології рослин, більш конкретно, до регуляції експресії генів у рослин.

ПЕРЕДУМОВИ ВИНАХОДУ

Експресія гетерологічних послідовностей ДНК у рослині-хазяїні залежить від наявності функціонально пов'язаного регуляторного елемента, що є функціональним у рослині-хазяїні. Вибір послідовності регуляторного елемента визначає, коли та де в організмі експресуватиметься гетерологічна послідовність ДНК. Якщо потрібно є експресія у визначених тканинах або органах, можна застосовувати регуляторні елементи, переважні для тканини. Якщо потрібно є експресія генів у відповідь на стимул, індукцйбельні регуляторні елементи є переважними регуляторними елементами. Навпаки, якщо потрібно є безперервна експресія у всіх клітинах рослини, використовують конститутивні промотори. Додаткові регуляторні послідовності, що розташовані вище та/або нижче від корової послідовності регуляторного елемента, можна включати в конструкції експресії у векторах для трансформації для забезпечення різних рівнів експресії гетерологічних нуклеотидних послідовностей у трансгенній рослині.

Часто потрібно є конститутивна експресія послідовності ДНК у рослині. Наприклад, підвищену стійкість рослини до інфекції, що спричиняють патогени, які передаються через ґрунт та переносяться повітрям, можна одержати шляхом генетичної маніпуляції з геномом рослини, щоб він містив конститутивний регуляторний елемент, функціонально пов'язаний з гетерологічним геном стійкості до патогену, внаслідок чого білки, які забезпечують стійкість до патогену, продукуються в бажаній рослинній тканині.

Альтернативно, може бути бажаним інгібування експресії нативної послідовності ДНК в рослинних тканинах для одержання потрібного фенотипу. У цьому випадку, таке інгібування можна здійснювати за допомогою трансформації рослини, щоб вона містила конститутивний промотор, функціонально пов'язаний з антисенсовою нуклеотидною послідовністю, внаслідок чого експресія антисенсової послідовності приводить до утворення РНК-транскрипту, який перешкоджає трансляції mRNA нативної послідовності ДНК.

Для генетичної модифікації рослин за допомогою методик генної інженерії та створення, таким чином, рослини з корисними ознаками потрібна доступність різноманітних промоторів. Створення сукупності промоторів надало б досліднику можливість конструювати рекомбінантні молекули ДНК, які можуть експресуватися на потрібних рівнях та за визначеної локалізації в клітині. Отже, колекція конститутивних промоторів дозволила б забезпечити експресію нової ознаки на потрібному рівні у потрібній тканині. Таким чином, для генетичної маніпуляції з рослинами потрібно виділення та дослідження конститутивних регуляторних елементів, здатних слугувати регуляторними ділянками для експресії гетерологічних нуклеотидних послідовностей, що становлять інтерес, у вимірюваний конститутивний спосіб.

КОРОТКИЙ ОПИС

Представлені композиції та способи регуляції експресії гетерологічної нуклеотидної послідовності, що становить інтерес, у рослині або рослинній клітині. Представлені молекули ДНК, що містять нові нуклеотидні послідовності регуляторних елементів, які ініціюють транскрипцію. У деяких варіантах здійснення регуляторний елемент має промоторну активність, що ініціює транскрипцію в рослинній клітині. Варіанти здійснення даного розкриття передбачають послідовність нуклеїнової кислоти, викладену в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, або комплементарну до неї послідовність, нуклеотидну послідовність, що містить щонайменше 20 суміжних нуклеотидів з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, де вказана послідовність ініціює транскрипцію в рослинній клітині, та нуклеотидну послідовність, що містить послідовність, щонайменше на 85% ідентичну послідовності, викладеній в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, де вказана послідовність ініціює транскрипцію в рослинній клітині.

Представлений спосіб експресії гетерологічної нуклеотидної послідовності в рослині або в рослинній клітині. Даний спосіб передбачає введення в рослину або рослинну клітину касети експресії, що містить гетерологічну нуклеотидну послідовність, що становить інтерес,

функціонально пов'язану з одним з регуляторних елементів згідно з даним розкриттям. Таким чином, послідовності регуляторних елементів є корисними для регуляції експресії функціонально пов'язаної гетерологічної нуклеотидної послідовності.

Додатково представлений спосіб конститутивної експресії нуклеотидної послідовності, що становить інтерес, у рослині. Спосіб передбачає введення в рослинну клітину касети експресії, що містить регуляторний елемент згідно з даним розкриттям, функціонально пов'язаний з гетерологічною нуклеотидною послідовністю, що становить інтерес.

Експресія нуклеотидної послідовності, що становить інтерес, може забезпечити модифікацію фенотипу рослини. Така модифікація передбачає модуляцію продукування ендогенного продукту з точки зору кількості, відносного розподілення тощо, або продукування екзогенного продукту експресії для забезпечення нової функції або продукту в рослині. У визначених способах і композиціях гетерологічна нуклеотидна послідовність, що становить інтерес, передбачає генний продукт, що надає стійкість до гербіцидів, стійкість до патогенів, стійкість до комах та/або змінену толерантність до засоленості, холоду або посухи.

Представлені касети експресії, що містять промоторні послідовності згідно з даним розкриттям, функціонально пов'язані з гетерологічною нуклеотидною послідовністю, що становить інтерес. Додатково представлені трансформовані рослинні клітини, рослинні тканини, насіння та рослини.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

На фігурі 1 показана структура регуляторної ділянки вірусу, що викликає деформацію листя глухої кропиви (LLDAV), та усічення регуляторної ділянки. Регуляторна ділянка LLDAV (FL) із 1226 пар основ складається з частини довгої міжгенної ділянки (LIR) вище короткої ORF і структури "стебло-петля". Послідовність простягається від 5'- до 3'-кінця останньої ORF в геномі LLDAV. Регуляторну ділянку усікали (TR) з 5'-кінця до сегментів, що склались з 1130 п. о., 904 п. о., 885 п. о., 443 п. о. та 113 п. о. Положення припустимого TATA-боксу зображено стрілкою.

На фігурі 2 показана послідовність нуклеїнової кислоти регуляторного елемента LLDAV повного розміру, що складає 1226 пар основ (SEQ ID NO: 1). Припустимий TATA-бокс підкреслений. Також вставленими стрілками зазначено 5'-кінці усічених регуляторних елементів LLDAV, як представлено послідовністю нуклеїнової кислоти усіченого регуляторного елемента LLDAV TR1 із 1130 пар основ (SEQ ID NO: 2), послідовністю нуклеїнової кислоти усіченого регуляторного елемента LLDAV TR2 із 904 пар основ (SEQ ID NO: 3), послідовністю нуклеїнової кислоти усіченого регуляторного елемента LLDAV TR3 із 885 пар основ (SEQ ID NO: 4), послідовністю нуклеїнової кислоти усіченого регуляторного елемента LLDAV TR4 із 443 пар основ (SEQ ID NO: 5) та послідовністю нуклеїнової кислоти усіченого регуляторного елемента LLDAV TR5 із 113 пар основ (SEQ ID NO: 6).

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

Дане розкриття відноситься до композицій та способів, спрямованих на регуляторні елементи рослин, та способів їхнього застосування. Композиції містять нуклеотидні послідовності регуляторної ділянки вірусу, що викликає деформацію листя глухої кропиви (LLDAV). Композиції додатково містять ДНК-конструкції, що містять нуклеотидну послідовність регуляторної ділянки LLDAV, функціонально пов'язану з гетерологічною нуклеотидною послідовністю, що становить інтерес. Зокрема, в даному розкритті представлені виділені молекули нуклеїнової кислоти, що містять нуклеотидну послідовність, викладену в SEQ ID NO: 1, та їхні фрагменти, варіанти та комплементарні до них послідовності.

Послідовності регуляторних елементів LLDAV згідно з даним розкриттям передбачають нуклеотидні конструкції, які забезпечують можливість ініціації транскрипції в рослині. У визначених варіантах здійснення послідовність регуляторного елемента LLDAV забезпечує можливість ініціації транскрипції в конститутивний спосіб. Такі конструкції згідно з даним розкриттям містять регульовані ділянки ініціації транскрипції, асоційовані з регуляцією розвитку рослини. Таким чином, композиції згідно з даним розкриттям передбачають ДНК-конструкції, що містять нуклеотидну послідовність, що становить інтерес, функціонально пов'язану з послідовністю регуляторного елемента LLDAV. Одне джерело послідовності регуляторної ділянки LLDAV викладене в SEQ ID NO: 1.

Композиції згідно з даним розкриттям передбачають нуклеотидні послідовності регуляторних елементів LLDAV, їхні фрагменти та варіанти. У визначених варіантах здійснення послідовності регуляторних елементів згідно з даним розкриттям є корисними для конститутивної експресії послідовностей, що становлять інтерес. Нуклеотидні послідовності згідно з даним розкриттям також застосовують у конструюванні векторів експресії для подальшої експресії гетерологічної нуклеотидної послідовності в рослині, що становить інтерес,

або як зонди для виділення інших LLDV-подібних регуляторних елементів.

Регуляторні елементи

Регуляторний елемент являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, що має регуляторну активність щодо гена, тобто молекулу нуклеїнової кислоти, яка має здатність впливати на транскрипцію та/або трансляцію молекули функціонально пов'язаного полінуклеотиду, що транскрибується. Термін “регуляторна активність щодо гена”, таким чином, відноситься до здатності впливати на експресію молекули функціонально пов'язаного полінуклеотиду, що транскрибується, шляхом впливу на транскрипцію та/або трансляцію цієї молекули функціонально пов'язаного полінуклеотиду, що транскрибується. Регуляторна активність щодо гена може бути позитивною та/або негативною, та при цьому ефект може характеризуватися за його часовими властивостями, просторовими властивостями, властивостями, пов'язаними з розвитком, властивостями, пов'язаними з тканинами, властивостями, пов'язаними з довкіллям, фізіологічними властивостями, патологічними властивостями, властивостями, пов'язаними з клітинним циклом та/або чутливістю до хімічних речовин, а також за кількісними або якісними показниками.

Регуляторні елементи, такі як промотори, лідерні послідовності, інтрони та ділянки термінації транскрипції являють собою молекули нуклеїнової кислоти, які мають регуляторну активність щодо гена та необхідні для загальної експресії генів у живих клітинах. Термін “регуляторний елемент” відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, що має регуляторну активність щодо гена, тобто молекули нуклеїнової кислоти, яка має здатність впливати на транскрипцію та/або трансляцію молекули функціонально пов'язаного полінуклеотиду, що транскрибується. Виділені регуляторні елементи, такі як промотори та лідерні послідовності, які функціонують в рослинах, отже, є корисними для модифікації фенотипів рослин за допомогою способів генної інженерії.

Регуляторні елементи можна характеризувати за їхнім профілем експресії, тобто як конститутивні, та/або за їхнім часовим профілем експресії, просторовим профілем експресії, профілем експресії, пов'язаним з розвитком, профілем експресії в тканинах, профілем експресії, пов'язаним з довкіллям, фізіологічним профілем експресії, профілем експресії при патології, профілем експресії, пов'язаним з клітинним циклом та/або чутливістю до хімічних речовин, а також за кількісними або якісними показниками. Промотор є придатним як регуляторний елемент для модулювання експресії молекули функціонально пов'язаного полінуклеотиду, що транскрибується.

Як застосовується в даному документі, термін “профіль експресії гена” являє собою будь-який профіль транскрипції функціонально пов'язаної молекули нуклеїнової кислоти в транскрибовану молекулу РНК. Експресія може характеризуватися за її часовими властивостями, просторовими властивостями, властивостями, пов'язаними з розвитком, властивостями, пов'язаними з тканинами, властивостями, пов'язаними з довкіллям, фізіологічними властивостями, патологічними властивостями, властивостями, пов'язаними з клітинним циклом та/або чутливістю до хімічних речовин, а також за кількісними або якісними показниками. Транскрибована молекула РНК може транслюватися з одержанням молекули білка або може являти собою антисенсову або іншу регуляторну молекулу РНК, таку як dsRNA, tRNA, rRNA, miRNA тощо.

Як застосовується в даному документі, термін “експресія білка” відноситься до будь-якого профілю трансляції транскрибованої молекули РНК у молекулу білка. Експресія білка може характеризуватися за її часовими властивостями, просторовими властивостями, властивостями, пов'язаними з розвитком, або за морфологічними властивостями, а також за кількісними або якісними показниками.

Як застосовується в даному документі, термін “промотор” загалом відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, яка залучена в розпізнавання РНК-полімеразою II та іншими білками (транс-активувальними факторами транскрипції) та зв'язування з ними для ініціації транскрипції. Промотор може бути первісно виділеним з 5'-ділянки, що не транслюється (5' UTR), геномної копії гена. Альтернативно, промотори можуть бути одержаними синтетично або являти собою молекули ДНК, з якими здійснювали маніпуляції. Промотори також можуть бути химерними, тобто промотор одержаний внаслідок злиття двох або більше гетерологічних молекул ДНК.

В одному варіанті здійснення представлені фрагменти промоторної послідовності, розкритої в даному документі. Фрагменти промотора можуть мати промоторну активність та можуть бути корисними окремо або в комбінації з іншими промоторами та фрагментами промотора, наприклад, при конструюванні химерних промоторів. У визначених варіантах здійснення представлені фрагменти промотора, що містять щонайменше приблизно 50, 95, 150, 250, 500 або приблизно 750 суміжних нуклеотидів з молекулою полінуклеотиду, що має промоторну

активність, розкрити в даному документі. Такі фрагменти можуть бути щонайменше на приблизно 85 відсотків, на приблизно 90 відсотків, на приблизно 95 відсотків, на приблизно 98 відсотків або на приблизно 99 відсотків або більше ідентичними еталонній послідовності при оптимальному вирівнюванні з еталонною послідовністю.

Промотор або фрагмент промотора також можна аналізувати щодо наявності відомих елементів промотора, тобто характерних послідовностей ДНК, таких як ТАТА-бокс та інші відомі мотиви сайтів зв'язування факторів транскрипції. Ідентифікація таких відомих елементів промотора може застосовуватися фахівцем у даній галузі техніки для створення варіантів промотора, які характеризуються подібним профілем експресії порівняно з вихідним промотором.

Як застосовується в даному документі, термін "енхансер" або "енхансерний елемент" відноситься до транскрипційного регуляторного елемента, що діє у цис-положенні, також відомого як цис-елемент, який забезпечує певний аспект загального профілю експресії, але зазвичай є недостатнім окремо для запуску транскрипції функціонально пов'язаної полінуклеотидної послідовності. На відміну від промоторів, енхансерні елементи зазвичай не містять сайт ініціації транскрипції (TSS) або ТАТА-бокс. За природних умов промотор може містити один або декілька енхансерних елементів, які впливають на транскрипцію функціонально пов'язаної полінуклеотидної послідовності. Виділений енхансерний елемент також може бути злитий із промотором з одержанням химерного промотора з цис-елементом, що визначає характер загальної модуляції генної експресії. Промотор або фрагмент промотора може містити один або декілька енхансерних елементів, які впливають на транскрипцію функціонально пов'язаних генів. Припускають, що багато з промотор-енхансерних елементів зв'язуються з ДНК-зв'язувальними білками та/або впливають на топологію ДНК з утворенням локальних конформацій, що селективно забезпечують доступ РНК-полімерази до матриці ДНК, або обмежують його, або полегшують селективне розкриття подвійної спіралі в сайті ініціації транскрипції. Енхансерний елемент може мати функцію зв'язування з факторами транскрипції, що регулюють транскрипцію. Деякі енхансерні елементи зв'язуються більш ніж з одним фактором транскрипції, та при цьому фактори транскрипції можуть взаємодіяти більш ніж з одним енхансерним доменом з різними значеннями афінності. Енхансерні елементи можна ідентифікувати за допомогою різних методик, в тому числі за допомогою делеційного аналізу, тобто видалення одного або декількох нуклеотидів із 5'-кінця або із внутрішньої частини промотора; аналізу ДНК-зв'язувальних білків за допомогою футпринтингу з ДНКазою I, аналізу інтерференції метилюванням, аналізів з визначенням зміни електрофоретичної рухливості, *in vivo* геномного футпринтингу за допомогою ПЛР, опосередкованої лігуванням, та інших традиційних аналізів; або за допомогою аналізу подібності послідовностей ДНК із застосуванням відомих мотивів цис-елементів або енхансерних елементів як послідовності-мішені або мотиву-мішені шляхом традиційних способів порівняння послідовностей ДНК, таких як BLAST. Тонку структуру енхансерного домену можна додатково досліджувати за допомогою мутагенезу (або заміни) одного або декількох нуклеотидів або за допомогою інших традиційних способів. Енхансерні елементи можна одержувати за допомогою хімічного синтезу або виділення з регуляторних елементів, що містять такі елементи, та їх можна синтезувати з додатковими фланкуючими нуклеотидами, що містять сайти для рестрикційних ферментів, корисні для здійснення маніпуляцій з підпослідовностями. Таким чином, даним розкриттям охоплені створення, конструювання та застосування енхансерних елементів згідно зі способами, розкритими в даному документі, для модулювання експресії молекул функціонально пов'язаного полінуклеотиду, що транскрибується.

Як застосовується в даному документі, термін "5' фланкуюча ділянка, що не трансліюється" відноситься до молекули ДНК, виділеної з 5'-ділянки, що не трансліюється (5' UTR), геномної копії гена та зазвичай визначається як нуклеотидний сегмент між сайтом початку транскрипції (TSS) і сайтом початку послідовності, що кодує білок. Ці послідовності або лідерні послідовності можуть бути одержаними синтетично або являти собою ДНК-елементи, з якими здійснювали маніпуляції. Лідерну послідовність можна застосувати як 5'-регуляторний елемент для модулювання експресії молекули функціонально пов'язаного полінуклеотиду, що транскрибується. Молекули лідерної послідовності можна застосовувати з гетерологічним промотором або з їхнім нативним промотором. Промоторні молекули згідно з даним розкриттям, таким чином, можуть бути функціонально пов'язані з їхньою нативною лідерною послідовністю або можуть бути функціонально пов'язані з гетерологічною лідерною послідовністю.

Як застосовується в даному документі, термін "химерний" відноситься до єдиної молекули ДНК, яка одержана шляхом злиття першої молекули ДНК з другою молекулою ДНК, при цьому ані перша, ані друга молекула ДНК зазвичай не зустрічаються в такій конфігурації, тобто злиті з

іншою. Химерна молекула ДНК, таким чином, являє собою нову молекулу ДНК, що зазвичай не зустрічається в природі. Як застосовується в даному документі, термін “химерний промотор” відноситься до промотора, одержаного шляхом такої маніпуляції з молекулами ДНК. У химерному промоторі можна об'єднати два або більше фрагментів ДНК; прикладом слугувало б злиття промотора з енхансерним елементом. Таким чином, даним розкриттям охоплені створення, конструювання та застосування химерних промоторів згідно зі способами, розкритими в даному документі, для модулювання експресії молекул функціонально пов'язаного полінуклеотиду, що транскрибується.

Слід розуміти, що нуклеотидні послідовності, розташовані всередині інтронів або 3' відносно послідовності кодуючої ділянки, також можуть сприяти регуляції експресії кодуючої ділянки, що становить інтерес. Приклади придатних інтронів включають без обмеження інтрон маїсу IVS6 або інтрон актину маїсу. Регуляторний елемент також може містити ті елементи, які розташовані нижче (3') відносно сайту ініціації транскрипції або всередині транскрибованих ділянок, або як ті, так й інші. У контексті даного розкриття посттранскрипційний регуляторний елемент може передбачати елементи, що функціонують після ініціації транскрипції, наприклад, трансляційні та транскрипційні енхансери, трансляційні та транскрипційні репресори та детермінанти стабільності mRNA.

Регуляторні елементи або їхні варіанти або фрагменти згідно з даним розкриттям можна функціонально зв'язувати з гетерологічними регуляторними елементами або промоторами для модулювання активності гетерологічного регуляторного елемента. Така модуляція передбачає підсилення або репресію транскрипційної активності гетерологічного регуляторного елемента, модулювання посттранскрипційних подій, або одне з підсилення або репресії транскрипційної активності гетерологічного регуляторного елемента та модулювання посттранскрипційних подій. Наприклад, один або декілька регуляторних елементів або їхніх фрагментів згідно з даним розкриттям можна функціонально зв'язувати з конститутивними, індукцйбельними або тканиноспецифічними промоторами або їхніми фрагментами для модулювання активності таких промоторів в рослинних клітинах у потрібних тканинах.

Дане розкриття охоплює композиції виділеної або рекомбінантної нуклеїнової кислоти. “Виділена” або “рекомбінантна” молекула нуклеїнової кислоти (або ДНК) застосовується в даному документі для позначення послідовності нуклеїнової кислоти (або ДНК), яка більше не перебуває в своєму природному середовищі, наприклад, перебуває в умовах *in vitro* або в гетерологічній рекомбінантній бактеріальній або рослинній клітині-хазяїні. Виділена або рекомбінантна молекула нуклеїнової кислоти або її біологічно активна частина практично не містить інший клітинний матеріал або культуральне середовище при одержанні за допомогою рекомбінантних методик або практично не містить хімічних попередників або інших хімічних речовин у разі хімічного синтезу. Виділена або рекомбінантна нуклеїнова кислота не містить послідовностей (в оптимальному випадку, послідовностей, що кодують білок), які за природних умов фланкують нуклеїнову кислоту (тобто послідовностей, розташованих на 5'- і 3'-кінцях нуклеїнової кислоти) в геномній ДНК організму, від якого одержана нуклеїнова кислота. Наприклад, у різних варіантах здійснення виділена молекула нуклеїнової кислоти може містити менше ніж приблизно 5 т.о., 4 т.о., 3 т.о., 2 т.о., 1 т.о., 0,5 т.о. або 0,1 т.о. з нуклеотидних послідовностей, які за природних умов фланкують молекулу нуклеїнової кислоти в геномній ДНК клітини, з якої одержана нуклеїнова кислота. Послідовності регуляторних елементів LLDAV згідно з даним розкриттям можуть бути виділені з 5'-ділянки, що не транслюється, яка фланкує їхні відповідні сайти ініціації транскрипції.

Фрагменти та варіанти розкритих нуклеотидних послідовностей промотора також охоплені даним розкриттям. Зокрема, фрагменти та варіанти послідовності регуляторного елемента LLDAV з SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 та/або SEQ ID NO: 6 можна застосовувати в ДНК-конструкціях згідно з даним розкриттям. Як застосовується в даному документі, термін “фрагмент” відноситься до частини послідовності нуклеїнової кислоти. Фрагменти послідовності регуляторного елемента LLDAV можуть зберігати біологічну активність, пов'язану з ініціацією транскрипції, більш переважно, пов'язану з керуванням транскрипцією конститутивним шляхом. Альтернативно, фрагменти нуклеотидної послідовності, корисні як зонди для гібридизації, не обов'язково можуть зберігати біологічну активність. Фрагменти нуклеотидної послідовності регуляторної ділянки LLDAV можуть варіювати в діапазоні від щонайменше приблизно 20 нуклеотидів, приблизно 50 нуклеотидів, приблизно 100 нуклеотидів та до повнорозмірної нуклеотидної послідовності згідно з даним розкриттям для промоторної ділянки гена.

Біологічно активну частину регуляторного елемента LLDAV можна одержувати за допомогою виділення частини послідовності регуляторного елемента LLDAV згідно з даним

розкриттям та оцінці промоторної активності цієї частини. Молекули нуклеїнової кислоти, що є фрагментами нуклеотидної послідовності регуляторного елемента LLDV, містять щонайменше приблизно 16, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900 або 1000 нуклеотидів або до кількості нуклеотидів, що присутні в повнорозмірній послідовності регуляторного елемента LLDV, розкритій у даному документі (наприклад, 1226 нуклеотидів для SEQ ID NO: 1).

У разі нуклеотидних послідовностей варіант передбачає делецію, та/або додавання одного або декількох нуклеотидів в одному або декількох внутрішніх сайтах у межах нативного полінуклеотиду, та/або заміну одного або декількох нуклеотидів в одному або декількох сайтах у нативному полінуклеотиді. Як застосовується в даному документі, "нативна" або "геномна" нуклеотидна послідовність передбачає нуклеотидну послідовність, що зустрічається в природі. У разі нуклеотидних послідовностей варіанти, що зустрічаються в природі, можна ідентифікувати із застосуванням широко відомих методик молекулярної біології, як, наприклад, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і методик гібридизації, викладених нижче. Варіантні нуклеотидні послідовності також передбачають нуклеотидні послідовності, одержані шляхом синтезу, такі як послідовності, одержані, наприклад, із застосуванням сайт-спрямованого мутагенезу. Як правило, варіанти конкретної нуклеотидної послідовності згідно з даним розкриттям будуть щонайменше на приблизно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або більше ідентичні цій конкретній нуклеотидній послідовності, як визначено із застосуванням програм вирівнювання послідовностей і параметрів, описаних в інших частинах даного документа. Біологічно активний варіант нуклеотидної послідовності згідно з даним розкриттям може відрізнятися від цієї послідовності лише за 1-15 нуклеотидами, лише за 1-10, лише за 6-10, лише за 5, лише за 4, 3, 2 або навіть за 1 нуклеотидом.

У деяких варіантах здійснення молекула нуклеїнової кислоти, що кодує регуляторну ділянку, являє собою "послідовність нуклеїнової кислоти, що відрізняється від геномної". Як застосовується в даному документі, "послідовність нуклеїнової кислоти, що відрізняється від геномної" відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, яка має одну або декілька змін послідовності нуклеїнової кислоти порівняно з нативною або геномною послідовністю нуклеїнової кислоти.

Варіантні нуклеотидні послідовності також охоплюють послідовності, одержані внаслідок мутагенної та рекомбіногенної процедури, такої як ДНК-шафлінг. За такої процедури можна здійснювати маніпуляції з нуклеотидними послідовностями регуляторного елемента LLDV для створення нових регуляторних елементів LLDV. Таким чином, бібліотеки рекомбінантних полінуклеотидів створюють з популяції споріднених за послідовностями полінуклеотидів, що містять ділянки послідовностей, які характеризуються суттєвою ідентичністю послідовностей та можуть піддаватися гомологічній рекомбінації *in vitro* або *in vivo*. Стратегії такого ДНК-шафлінгу відомі з рівня техніки. Див., наприклад, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) *Nature* 391:288-291; та патенти США №№ 5605793 і 5837458.

Нуклеотидні послідовності згідно з даним розкриттям можна застосовувати для виділення відповідних послідовностей з інших організмів, зокрема інших рослин, більш конкретно з інших однодольних рослин. Таким чином, способи, такі як ПЛР, гібридизація тощо, можна застосовувати для ідентифікації таких послідовностей на основі їхньої гомології з послідовностями, викладеними в даному документі. Послідовності, виділені на основі ідентичності їхньої послідовності з повною послідовністю регуляторного елемента LLDV, викладеною в даному документі, або її фрагментами, охоплені даним розкриттям.

У разі підходу, що базується на ПЛР, олігонуклеотидні праймери можна конструювати для застосування в ПЛР-реакціях для ампліфікації відповідних послідовностей ДНК на основі геномної ДНК, яку виділяють з будь-якої рослини, що становить інтерес. Способи конструювання ПЛР-праймерів і ПЛР-клонування загалом відомі з рівня техніки та розкриті в Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York), у подальшому Sambrook. Див. також Innis et al. Eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); та Innis and Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Відомі способи ПЛР включають без обмеження способи із застосуванням парних праймерів, гніздових праймерів, одиночних специфічних праймерів, вироджених праймерів, ген-специфічних праймерів, вектор-специфічних праймерів, праймерів, в яких частина нуклеотидів піддається помилковому спарюванню тощо.

В гібризаційних методиках всю відому нуклеотидну послідовність або її частину застосовують як зонд, що селективно гібридується з іншими відповідними нуклеотидними послідовностями, які присутні в популяції клонованих фрагментів геномної ДНК з вибраного організму. Зонди для гібридації можна мітити за допомогою групи, яку можна детектувати, такої як P-32, або за допомогою будь-якого іншого маркера, який можна детектувати. Таким чином, наприклад, зонди для гібридації можна одержати шляхом мічення синтетичних олігонуклеотидів на основі послідовності регуляторного елемента LLDV згідно з даним розкриттям. Способи одержання зондів для гібридації та для створення геномних бібліотек, як правило, відомі з рівня техніки та розкриті в Sambrook.

Наприклад, повну послідовність регуляторного елемента LLDV, розкриту в даному документі, або одну або декілька її частин можна застосовувати як зонд, що здатний специфічно гібридуватися з відповідними послідовностями регуляторного елемента LLDV і матричними РНК. Для досягнення специфічної гібридації за різних умов, такі зонди включають послідовності, які є унікальними в послідовностях регуляторного елемента LLDV та мають довжину щонайменше приблизно 10 нуклеотидів або довжину щонайменше приблизно 20 нуклеотидів. Такі зонди можна застосовувати для ампліфікації за допомогою ПЛР відповідних послідовностей регуляторного елемента PVCV з вибраної рослини. Цю методику можна застосовувати для виділення додаткових кодуючих послідовностей з потрібного організму або як діагностичний аналіз для визначення наявності кодуючих послідовностей в організмі. Методики гібридації включають гібризаційний скринінг висіяних на чашки Петрі бібліотек ДНК (бляшок або колоній; див., наприклад, Sambrook).

Гібридацію таких послідовностей можна проводити у жорстких умовах. Передбачається, що терміни "жорсткі умови" або "жорсткі умови гібридації" позначають умови, за яких зонд буде гібридуватися зі своєю цільовою послідовністю з вищим ступенем детекції, ніж з іншими послідовностями (наприклад, щонайменше в 2 рази вищим порівняно з фоновим). Жорсткі умови залежать від послідовності і будуть відрізнятися за різних обставин. Шляхом регулювання жорсткості умов гібридації та/або відмивання можна ідентифікувати цільові послідовності, які на 100% комплементарні зонду (гібридація з гомологічним зондом). Альтернативно, умови жорсткості можна регулювати для забезпечення деякого помилкового спарювання в послідовностях, щоб виявляти більш низькі ступені подібності (гібридація з гетерологічним зондом). Зазвичай зонд має довжину менше ніж приблизно 1000 нуклеотидів, в оптимальному випадку він має довжину менше ніж 500 нуклеотидів.

Як правило, жорсткі умови будуть такими, за яких концентрація солі становить менше приблизно 1,5 М іонів Na, як правило, концентрація іонів Na (або інших солей) становить від приблизно 0,01 до 1,0 М при рН 7,0-8,3, а температура становить щонайменше приблизно 30°C для коротких зондів (наприклад, 10-50 нуклеотидів) і щонайменше приблизно 60°C для довгих зондів (наприклад, що перевищують 50 нуклеотидів). Жорстких умов також можна досягати за допомогою додавання засобів для дестабілізації, таких як формамід. Ілюстративні умови низької жорсткості передбачають гібридацію у буферному розчині з 30-35% формаміду, 1 М NaCl, 1% SDS (додецилсульфат натрію) при 37°C і відмивання в 1X-2X SSC (20X SSC = 3,0 М NaCl/0,3 М тринатрію цитрат) при 50-55°C. Ілюстративні умови помірної жорсткості передбачають гібридацію в 40-45% формаміді, 1,0 М NaCl, 1% SDS при 37°C і відмивання в 0,5X-1X SSC при 55-60°C. Ілюстративні умови високої жорсткості передбачають гібридацію у 50% формаміді, 1 М NaCl, 1% SDS при 37°C і остаточне відмивання в 0,1X SSC при 60-65°C протягом щонайменше 30 хвилин. Тривалість гібридації, в цілому, становить менше приблизно 24 годин, зазвичай від приблизно 4 до приблизно 12 годин. Тривалість часу відмивання становитиме щонайменше період часу, достатній для досягнення рівноваги.

Специфічність, як правило, залежить від відмивань після гібридації, причому ключовими факторами є іонна сила та температура розчину для остаточного відмивання. Для гібридів ДНК-ДНК T_m (температуру плавлення) можна приблизно розраховувати на основі рівняння в Meinkoth and Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ форм.}) - 500/L$; де М являє собою молярність одновалентних катіонів, % GC являє собою відсотковий вміст гуанозинових і цитозинових нуклеотидів у ДНК, % форм. являє собою відсотковий вміст формаміду в гібризаційному розчині, та L являє собою довжину гібрида в парах основ. T_m являє собою температуру (за визначеної іонної сили та рН), за якої 50% комплементарної цільової послідовності гібридується з зондом, що ідеально збігається. Знижують T_m на приблизно 1°C для кожного 1% помилкового спарювання; таким чином, T_m , умови гібридації та/або відмивання можна відрегулювати для гібридації з послідовностями з потрібною ідентичністю. Наприклад, якщо здійснюють пошук послідовностей з ідентичністю >90%, T_m можна знижувати на 10°C. Зазвичай, жорсткі умови вибирають так, щоб температура

була на приблизно 5°C нижча за T_m для визначеної послідовності та комплементарної до неї послідовності за визначеної іонної сили та pH. Проте в умовах високої жорсткості можна проводити гібридизацію та/або відмивання при температурі на 1, 2, 3 або 4°C нижчій за T_m ; в умовах помірної жорсткості можна проводити гібридизацію та/або відмивання при температурі на 6, 7, 8, 9 або 10°C нижчій за T_m ; в умовах низької жорсткості можна проводити гібридизацію та/або відмивання при температурі на 11, 12, 13, 14, 15 або 20°C нижчій за T_m . Фахівцям у даній галузі техніки буде зрозуміло, що варіації жорсткості розчинів для гібридизації та/або відмивання по суті описані за допомогою рівняння, складів розчинів для гібридизації та відмивання та потрібної T_m . Якщо потрібний ступінь помилкового спарювання призводить до T_m менше 45°C (водний розчин) або 32°C (розчин формаміду), переважним є збільшення концентрації SSC, щоб можна було застосовувати більш високу температуру. Докладний посібник з гібридизації нуклеїнових кислот наведений у Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York) та Ausubel et al. eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Див. також Sambrook.

Таким чином, виділені послідовності, що мають активність конститутивного промотора та гібридизуються за жорстких умов з послідовностями регуляторних елементів LLDAV, розкритими в даному документі, або їхніми фрагментами, охоплені даним розкриттям.

Наступні терміни застосовують для опису спорідненості послідовностей у двох або більше нуклеїнових кислот або полінуклеотидів: (a) "еталонна послідовність", (b) "вікно порівняння", (c) "ідентичність послідовності", (d) "відсоткова ідентичність послідовності" та (e) "значна ідентичність".

(a) Як застосовується в даному документі, "еталонна послідовність" являє собою визначену послідовність, яку застосовують як основу для порівняння послідовностей. Еталонна послідовність може являти собою скорочену версію або повну форму визначеної послідовності; наприклад, являти собою сегмент повнорозмірної кДНК або послідовності гена або всю кДНК або послідовність гена.

(b) Як застосовується в даному документі, "вікно порівняння" відноситься до безперервного та визначеного сегмента в послідовності полінуклеотиду, при цьому послідовність полінуклеотиду у вікні порівняння може містити додавання або делеції (тобто гепи) порівняно з еталонною послідовністю (яка не містить додавань або делецій) для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Як правило, довжина вікна порівняння становить щонайменше 20 суміжних нуклеотидів і необов'язково може становити 30, 40, 50, 100 або більше. Фахівці в даній галузі техніки зрозуміють, що аби уникнути високої подібності з еталонною послідовністю внаслідок включення гепів в послідовність полінуклеотиду, як правило, вводиться штраф за геп, та його віднімають від кількості збігів.

Способи вирівнювання послідовностей для порівняння добре відомі з рівня техніки. Таким чином, визначення відсоткової ідентичності послідовностей між будь-якими двома послідовностями можна виконувати із застосуванням математичного алгоритму. Необмежувальними прикладами подібних математичних алгоритмів є алгоритм за Myers and Miller (1988) CABIOS 4:11-17; алгоритм локального вирівнювання за Smith et al. (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; алгоритм глобального вирівнювання за Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; спосіб пошуку локального вирівнювання за Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-2448; алгоритм за Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, модифікований за Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877.

Для порівняння послідовностей можна застосовувати комп'ютерні впровадження цих математичних алгоритмів з метою визначення ідентичності послідовностей. Такі впровадження включають без обмеження CLUSTAL в програмі PC/Gene (доступна від Intelligenetics, Маунтін-В'ю, Каліфорнія); програму ALIGN (версія 2.0) та GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA та TFASTA в GCG Wisconsin Genetics Software Package, версія 10 (доступні від Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, Сан-Дієго, Каліфорнія, США). Вирівнювання за допомогою цих програм можна виконувати із застосуванням параметрів за замовчуванням. Програма CLUSTAL добре описана в Higgins et al. (1988) *Gene* 73:237-244 (1988); Higgins et al. (1989) CABIOS 5:151-153; Corpet et al. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang et al. (1992) CABIOS 8:155-65; та Pearson et al. (1994) *Meth. Mol. Biol.* 24:307-331. Програма ALIGN базується на алгоритмі з Myers and Miller (1988), що згаданий вище. При порівнянні амінокислотних послідовностей у програмі ALIGN можна застосовувати таблицю ваги заміни залишків PAM120, штраф за подовження гепу 12 і штраф за відкриття гепу 4. Програми BLAST за Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403 засновані на алгоритмі з Karlin and Altschul (1990), що згаданий вище. Пошуки нуклеотидних послідовностей в BLAST можна виконувати за допомогою програми BLASTN з параметрами: вага вирівнювання

= 100, довжина слова = 12 з одержанням нуклеотидних послідовностей, гомологічних нуклеотидній послідовності, що кодує білок згідно з даним розкриттям. Пошуки білкових послідовностей в BLAST можна виконувати за допомогою програми BLASTX з параметрами: вага вирівнювання = 50, довжина слова = 3 з одержанням амінокислотних послідовностей, гомологічних білку або поліпептиду згідно з даним розкриттям. Для одержання вирівнювань з гепами з метою порівняння можна використовувати Gapped BLAST (в BLAST 2.0), як описано в Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Альтернативно, можна застосовувати PSI-BLAST (в BLAST 2.0) для здійснення ітераційного пошуку, який виявляє віддалені зв'язки між молекулами. Див. Altschul et al. (1997) вище. При використанні BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST можна застосовувати параметри за замовчуванням відповідних програм (наприклад, BLASTN для нуклеотидних послідовностей, BLASTX для білків). Див. веб-сайт Національного центру біотехнологічної інформації. Вирівнювання можна здійснювати вручну за допомогою проглядання.

Якщо не вказане інше, значення ідентичності/подібності послідовностей, наведені в даному документі, відносяться до значення, одержаного за допомогою GAP версії 10 із застосуванням наступних параметрів: % ідентичності та % подібності для нуклеотидної послідовності із застосуванням штрафу за відкриття гепу 50, та штрафу за подовження гепу 3, та матриці заміन `nwsgapdna.cmp`; % ідентичності та % подібності для амінокислотної послідовності із застосуванням штрафу за відкриття гепу 8, та штрафу за подовження гепу 2, та матриці замін BLOSUM62; або будь-якої еквівалентної до неї програми. Під "еквівалентною програмою" мають на увазі будь-яку програму для порівняння послідовностей, в якій для будь-яких двох послідовностей, що розглядаються, здійснюють вирівнювання з ідентичними збігами нуклеотидних або амінокислотних залишків та ідентичною відсотковою ідентичністю послідовності порівняно з відповідним вирівнюванням, яке здійснюється за допомогою GAP версії 10.

У GAP застосовується алгоритм з Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453, щоб відшукати вирівнювання двох повних послідовностей, яке максимізує число збігів і мінімізує число гепів. GAP розглядає усі можливі варіанти вирівнювання та положення гепів і створює вирівнювання з найбільшим числом основ, що збігаються, та найменшою кількістю гепів. Вона передбачає можливість призначення штрафу за відкриття гепу та штрафу за подовження гепу в одиницях основ, що збігаються. GAP має враховувати кількість збігів від штрафу за відкриття гепу для кожного гепу, який він вводить. Якщо вибраний штраф за подовження гепу більший за нуль, GAP має додатково враховувати кожний введений геп з конкретною довжиною гепу, що помножена на штраф за подовження гепу. Значення за замовчуванням для штрафу за відкриття гепу та значення за замовчуванням для штрафу за подовження гепу в GCG Wisconsin Genetics Software Package версії 10 для білкових послідовностей становлять 8 та 2, відповідно. Для нуклеотидних послідовностей штраф за відкриття гепу за замовчуванням становить 50, у той час як штраф за подовження гепу за замовчуванням становить 3. Штрафи за відкриття гепу та за подовження гепу можуть бути виражені у вигляді цілого числа, вибраного з групи, що складається з цілих чисел від 0 до 200. Таким чином, наприклад, штрафи за відкриття гепу та за подовження гепу можуть становити 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 або більше.

GAP є одним представником родини найкращих засобів вирівнювання. Існує багато представників цієї родини, але жоден інший представник не має кращої якості. GAP відображує чотири числові показники для вирівнювань: якість, співвідношення, ідентичність і подібність. Якість являє собою показник, який максимально збільшують для вирівнювання послідовностей. Співвідношення являє собою якість, поділену на число основ у більш короткому сегменті. Відсоткова ідентичність являє собою відсоток символів, які фактично збігаються. Відсоткова подібність являє собою відсоток символів, які є подібними. Символи, які знаходяться навпроти гепів, ігнорують. Подібність враховують, якщо значення за матрицею замінів для пари символів є більшим або дорівнює 0,50, що є пороговим значенням подібності. Матриця замінів, що застосовується в версії 10 пакету програмного забезпечення GCG Wisconsin Genetics Software Package, являє собою BLOSUM62 (див. Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915).

(с) Як застосовується в даному документі, "ідентичність послідовностей" або "ідентичність" в контексті двох послідовностей нуклеїнової кислоти або поліпептидних послідовностей відноситься до залишків у двох послідовностях, які є однаковими при вирівнюванні для максимальної відповідності в межах визначеного вікна порівняння. Якщо відсоткову ідентичність послідовностей застосовують щодо білків, розуміють, що положення залишків, які не є ідентичними, часто відрізняються за консервативними амінокислотними замінами, при цьому

амінокислотні залишки замінені на інші амінокислотні залишки з аналогічними хімічними властивостями (наприклад, зарядом або гідрофобністю) та, внаслідок цього, не змінюють функціональні властивості молекули. Якщо послідовності відрізняються за консервативними замінами, то відсоткову ідентичність послідовностей можна коригувати з внесенням поправки на консервативну природу заміни. Кажуть, що послідовності, які відрізняються за такими консервативними замінами, характеризуються "подібністю послідовностей" або "подібністю". Засоби для здійснення такого коригування добре відомі фахівцям у даній галузі техніки. Як правило, це передбачає оцінку в балах консервативної заміни як часткового, а не повного незбігу, що, таким чином, збільшує відсоткову ідентичність послідовностей. Таким чином, наприклад, якщо ідентичній амінокислоті присвоюють бал 1, а неконсервативній заміні присвоюють бал нуль, то консервативній заміні присвоюють бал від нуля до 1. Оцінку в балах консервативних замін розраховують, наприклад, як впроваджено в програмі PC/GENE (Intelligenetics, Маунтін-В'ю, Каліфорнія).

(d) Як застосовується в даному документі, "відсоткова ідентичність послідовностей" означає значення, визначене шляхом порівняння двох послідовностей з оптимальним вирівнюванням в межах вікна порівняння, де частина послідовності полінуклеотиду у вікні порівняння може містити додавання або делеції (тобто гепи) порівняно з еталонною послідовністю (яка не містить додавань або делецій) для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Відсоток розраховують шляхом визначення числа положень, в яких ідентична основа нуклеїнової кислоти або амінокислотний залишок зустрічаються в обох послідовностях, з одержанням числа положень, що збігаються, ділення числа положень, що збігаються, на загальне число положень у вікні порівняння та множення результату на 100 з одержанням відсоткової ідентичності послідовностей.

(e) Термін "значна ідентичність" полінуклеотидних послідовностей означає, що полінуклеотид містить послідовність, щонайменше на 70%, щонайменше на 80%, щонайменше на 90% та щонайменше на 95% ідентичну у порівнянні до еталонної послідовності за допомогою однієї з описаних програм вирівнювання із застосуванням стандартних параметрів.

Іншим показником того, що нуклеотидні послідовності мають значний ступінь ідентичності, є те, що дві молекули гібридизуються одна до одної за жорстких умов. Зазвичай жорсткі умови вибирають так, щоб температура була на приблизно 5°C нижчою за T_m для визначеної послідовності за визначеної іонної сили та pH. Проте жорсткі умови охоплюють значення температури в діапазоні від на приблизно 1°C до на приблизно 20°C нижче за T_m залежно від потрібного ступеня жорсткості, як іншим чином зазначено в даному документі.

Як застосовується в даному документі, термін "рослина" включає рослинні клітини, протопласти рослинних клітин, тканинні культури рослинних клітин, з яких можна регенерувати рослини, рослинні калюси, скупчення рослинних клітин і рослинні клітини, які є інтактними в рослинах або частинах рослин, таких як зародки, пилок, насіннєві зачатки, насіння, листки, квітки, гілки, плоди, зерна, колоски, качани, листяні обгортки, стебла, корені, кінчики коренів, пиляки тощо. Передбачається, що зерно означає зріле насіння, одержане промисловими рослинниками для цілей, відмінних від вирощування або відтворення видів. Потомство, варіанти та мутанти регенерованих рослин також включені в обсяг даного розкриття, за умови, що ці частини містять введені полінуклеотиди.

Дане розкриття можна застосовувати для трансформації будь-яких видів рослин, у тому числі без обмежень однодольних та дводольних рослин. Приклади видів рослин включають кукурудзу (*Zea mays*), *Brassica* sp. (наприклад, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), зокрема види *Brassica*, придатні як джерело олії з насіння рослин, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), жито (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (наприклад, просо африканське (*Pennisetum glaucum*), просо звичайне (*Panicum miliaceum*), мишій італійський (*Setaria italica*), просо пальчасте (*Eleusine coracana*)), соняшник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеницю (*Triticum aestivum*), сою (*Glycine max*), тютюн (*Nicotiana tabacum*), картоплю (*Solanum tuberosum*), різновиди арахісу (*Arachis hypogaea*), бавовник (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), солодку картоплю (*Ipomoea batatas*), маніок (*Manihot esculenta*), кавове дерево (*Coffea* spp.), кокосову пальму (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусові дерева (*Citrus* spp.), шоколадне дерево (*Theobroma cacao*), чайний кущ (*Camellia sinensis*), банан (*Musa* spp.), авокадо (*Persea americana*), інжир (*Ficus casica*), гуаву (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), маслину (*Olea europaea*), папайю (*Carica papaya*), кеш'ю (*Anacardium occidentale*), макадамію (*Macadamia integrifolia*), мигдаль (*Prunus amygdalus*), різновиди цукрового буряку (*Beta vulgaris*), цукрову тростину (*Saccharum* spp.), різновиди вівса, ячмінь, овочі, декоративні рослини та хвойні дерева.

Овочі включають томати (*Lycopersicon esculentum*), латук (наприклад, *Lactuca sativa*),

квасоллю звичайну (*Phaseolus vulgaris*), лімську квасоллю (*Phaseolus limensis*), різновиди гороху (*Lathyrus* spp.) і представників роду *Cucumis*, таких як огірок (*C. sativus*), канталупа (*C. cantalupensis*) і диня мускусна (*C. melo*). Декоративні рослини включають азалію (*Rhododendron* spp.), гортензію (*Macrophylla hydrangea*), гібіскус (*Hibiscus rosasanensis*), різновиди троянд (*Rosa* spp.), різновиди тюльпанів (*Tulipa* spp.), різновиди нарцисів (*Narcissus* spp.), різновиди посконнику (*Eupatorium hybrida*), гвоздику (*Dianthus caryophyllus*), пуансетію (*Euphorbia pulcherrima*) та хризантему.

Хвойні дерева, які можна використовувати при здійсненні даного розкриття на практиці, включають, наприклад, види сосни, такі як сосна ладанна (*Pinus taeda*), сосна Еліота (*Pinus elliotii*), сосна жовта (*Pinus ponderosa*), широкохвойна сосна (*Pinus contorta*) та сосна промениста (*Pinus radiata*); псевдотсугу Мензика (*Pseudotsuga menziesii*); тсугу канадську (*Tsuga canadensis*); ялину біла (*Picea glauca*); секвойю вічнозелену (*Sequoia sempervirens*); справжні ялиці, такі як ялиця миловидна (*Abies amabilis*) та ялиця бальзамічна (*Abies balsamea*); та кедр, такі як туя (*Thuja plicata*) та кипарис аляскінський (*Chamaecyparis nootkatensis*). У визначених варіантах здійснення рослини згідно з даним розкриттям являють собою культурні рослини (наприклад, кукурудзу, люцерну, соняшник, *Brassica*, сою, бавовник, сафлор, арахіс, сорго, пшеницю, просо, тютюн тощо). В інших варіантах здійснення рослини кукурудзи та сої є оптимальними, а ще у декількох інших варіантах здійснення оптимальними є рослини кукурудзи.

Інші рослини, що становлять інтерес, включають зернові рослини, які дають насіння, що становить інтерес, олійні рослини та бобові рослини. Насіння, що становить інтерес, включає насіння зернових культур, таких як кукурудза, пшениця, ячмінь, рис, сорго, жито тощо. Олійні рослини включають бавовник, сою, сафлор, соняшник, представників *Brassica*, маїс, люцерну, пальму, кокосову пальму тощо. Бобові рослини включають різновиди бобів та різновиди гороху. Різновиди бобів включають гуар, ріжкове дерево, гуньбу, сою, різновиди квасолі звичайної, вігну китайську, золотисту квасоллю, лімську квасоллю, стручкову квасоллю, різновиди сочевиці, турецький горох тощо.

Як застосовується в даному документі, термін “молекула полінуклеотиду, що транскрибується” відноситься до будь-якої молекули ДНК, яка може транскрибуватися в молекулу РНК, в тому числі без обмежень таких, які мають послідовності, що кодують білок, і таких, які мають послідовності, корисні для супресії генів. “Трансген” відноситься до молекули полінуклеотиду, що транскрибується, гетерологічної відносно клітини-хазяїна та/або молекули полінуклеотиду, що транскрибується, штучно введеної в геном клітини-хазяїна.

Регуляторний елемент за даним винаходом може бути функціонально пов'язаним з молекулою полінуклеотиду, що транскрибується, яка є гетерологічною відносно регуляторної молекули. Як застосовується в даному документі, термін “гетерологічна” стосується комбінації двох або більше молекул полінуклеотиду, які зазвичай не перебувають у такій комбінації в природі. Наприклад, дві молекули можуть походити від різних видів та/або дві молекули можуть походити з різних генів, наприклад, різних генів одного виду або однакових генів різних видів. Регуляторний елемент, таким чином, є гетерологічним відносно молекули функціонально пов'язаного полінуклеотиду, що транскрибується, якщо така комбінація зазвичай не зустрічається в природі, тобто ця молекула полінуклеотиду, що транскрибується, в природі зазвичай не є функціонально пов'язаною в комбінації з цією молекулою регуляторного елемента.

Молекула полінуклеотиду, що транскрибується, як правило, може являти собою будь-яку молекулу ДНК, експресія РНК-транскрипту якої є потрібною. Така експресія РНК-транскрипту може привести до трансляції одержаної молекули mRNA і, таким чином, до експресії білка. Альтернативно, молекулу полінуклеотиду, що транскрибується, можна конструювати так, щоб, у підсумку, спричиняти знижену експресію визначеного гена або білка. Цього можна досягти із застосуванням молекули полінуклеотиду, що транскрибується, що орієнтована в антисенсовому напрямку. Фахівцю в даній галузі техніки добре відоме застосування такої антисенсової технології. Коротко, в ході транскрипції антисенсової молекули полінуклеотиду, що транскрибується, РНК-продукт гібридується з комплементарною молекулою РНК всередині клітини та блокує її. Ця дуплексна молекула РНК не може транслюватися клітинним апаратом трансляції з утворенням білка, та вона піддається деградації в клітині. Будь-який ген може надаватися негативній регуляції в такий спосіб.

Таким чином, один варіант здійснення даного винаходу являє собою регуляторний елемент згідно з даним винаходом, такий як представлений в SEQ ID NO: 1-6, функціонально пов'язаний з молекулою полінуклеотиду, що транскрибується, щоб модулювати транскрипцію молекули полінуклеотиду, що транскрибується, на потрібному рівні або з потрібним профілем після введення вказаної конструкції в рослинну клітину. В одному варіанті здійснення молекула

полінуклеотиду, що транскрибується, містить ділянку гена, що кодує білок, і промотор впливає на транскрипцію молекули РНК, яка транслюється та експресується у вигляді білкового продукту. В іншому варіанті здійснення молекула полінуклеотиду, що транскрибується, містить антисенсову ділянку гена, та промотор впливає на транскрипцію молекули антисенсової РНК або іншої подібної інгібіторної молекули РНК для інгібування експресії визначеної молекули РНК, що становить інтерес, у цільовій клітині-хазяїні.

Молекули полінуклеотидів, що транскрибуються, які експресуються завдяки регуляторним елементам LLDAV згідно з даним розкриттям, можна застосовувати для зміни фенотипу рослини. Різні зміни фенотипу, що становлять інтерес, включають модифікацію експресії гена, зміну механізму захисту рослини від патогену або комах, збільшення толерантності рослини до гербіцидів, що потрапляють у рослину, зміну розвитку коренів у відповідь на стресові фактори довкілля, модуляцію відповіді рослини на засоленість, температуру (високу та низьку), посуху тощо. Цих результатів можна досягти за допомогою експресії гетерологічної нуклеотидної послідовності, що становить інтерес, що містить прийнятний генний продукт. У визначених варіантах здійснення гетерологічна нуклеотидна послідовність, що становить інтерес, являє собою ендегенну послідовність рослини, рівень експресії якої є підвищеним у рослині або частині рослини. Альтернативно, результатів можна досягти за допомогою забезпечення зниження експресії одного або декількох ендегенних генних продуктів, зокрема ферментів, транспортерів або кофакторів, або шляхом впливу на поглинання поживних речовин у рослині. Ці зміни приводять у результаті до зміни у фенотипі трансформованої рослини.

Гени, що становлять агрономічний інтерес

Молекули полінуклеотидів, що транскрибуються, можуть являти собою гени, що становлять агрономічний інтерес. Як застосовується в даному документі, термін "ген, що становить агрономічний інтерес" відноситься до молекули полінуклеотиду, що транскрибується, яка у разі експресії в конкретній рослинній тканині, рослинній клітині або типі рослинних клітин, забезпечує потрібну характеристику, пов'язану з морфологією, фізіологією, ростом, розвитком, врожайністю, продуктивністю, харчовою цінністю, стійкістю до захворювань або шкідників та/або толерантністю до впливів довкілля або хімічних речовин. Гени, що становлять агрономічний інтерес, включають без обмежень такі гени, що кодують білок, пов'язаний з урожайністю, білок, пов'язаний зі стійкістю до стресового фактора, білок, пов'язаний з регуляцією розвитку, білок, пов'язаний з диференціюванням тканин, білок меристеми, білок, пов'язаний з відповіддю на вплив довкілля, білок, пов'язаний зі старінням, білок, чутливий до дії гормону, білок, пов'язаний з опаданням листків, білок донорної тканини, білок акцепторної тканини, білок, пов'язаний з регуляцією розвитку квіток, білок насіння, білок, пов'язаний зі стійкістю до гербіцидів, білок, пов'язаний зі стійкістю до захворювань, фермент біосинтезу жирних кислот, фермент біосинтезу токоферолу, фермент біосинтезу амінокислот, пестицидний білок або будь-яку іншу речовину, як, наприклад, антисенсову молекулу або молекулу для RNAi, що здійснює цілеспрямований вплив на конкретний ген із забезпеченням його супресії. Продукт гена, що становить агрономічний інтерес, може проявляти активність в межах рослини із забезпеченням ефекту щодо фізіологічних властивостей або метаболізму рослини або може проявляти активність як пестицидна речовина в їжі шкідника, який живиться рослиною.

В одному варіанті здійснення регуляторний елемент згідно з даним розкриттям є вбудованим в конструкцію, внаслідок чого регуляторна молекула функціонально пов'язана з молекулою полінуклеотиду, що транскрибується, тобто геном, що становить агрономічний інтерес. Експресія гена, що становить агрономічний інтерес, є бажаною для забезпечення агрономічно корисної ознаки. Агрономічно корисна ознака може являти собою, наприклад, без обмежень, толерантність до гербіцидів, контроль комах, модифіковану врожайність, стійкість до грибкових захворювань, стійкість до вірусів, стійкість до нематод, стійкість до бактеріальних захворювань, ріст і розвиток рослини, продукування крохмалю, модифіковане продукування олій, високий рівень продукування олій, модифікований вміст жирних кислот, високий рівень продукування білка, досягання плодів, поліпшені поживні властивості для тварин і людини, біополімери, стійкість до стресових факторів довкілля, пептиди для фармацевтичного застосування та секреторні пептиди, поліпшену переробку, поліпшену засвоюваність, продукування ферментів, запах, фіксацію азоту, одержання гібридного насіння, одержання волокон і одержання біопалива.

Гени стійкості до комах можуть кодувати стійкість до шкідників, які пошкоджують врожай та є перешкодою для його одержання, таких як кукурудзяний жук, совка, кукурудзяний метелик тощо. Такі гени включають, наприклад, гени токсичного білка *Bacillus thuringiensis* (патенти США №№ 5366892; 5747450; 5736514; 5723756; 5593881; та Geiser et al. (1986) Gene 48:109); тощо.

Гени, що кодують ознаки, пов'язані зі стійкістю до захворювань, включають гени

детоксикації, такі як гени, що забезпечують детоксикацію фумонозину (патент США № 5792931); гени авірулентності (*avr*) та стійкості до захворювань (*R*) (Jones et al. (1994) Science 266:789; Martin et al. (1993) Science 262:1432; та Mindrinos et al. (1994) Cell 78:1089) тощо.

Ознаки, пов'язані зі стійкістю до гербіцидів, можуть передбачати гени, що кодують стійкість до гербіцидів, які спричиняють інгібувальний вплив на ацетолактатсинтазу (ALS), зокрема гербіцидів типу сульфонілсечовини (наприклад, ген ацетолактатсинтази (ALS), що містить мутації, що ведуть до такої стійкості, зокрема мутації S4 та/або Hra), гени, що кодують стійкість до гербіцидів, які спричиняють інгібувальний вплив на глутамінсинтазу, таких як фосфінотрицин або *basta* (наприклад, ген *bar*); гліфосату (наприклад, ген EPSPS і ген GAT; див., наприклад, публікацію патентного документа США № 20040082770 і WO 03/092360); або інші такі гени, відомі з рівня техніки. Ген *bar* кодує стійкість до гербіциду *basta*, ген *nrptII* кодує стійкість до антибіотиків канаміцину та генетицину, а мутанти ALS-гена кодують стійкість до гербіциду хлорсульфурону.

Стійкість до гліфосфату надає мутантна 5-енолпіруват-шикімат-3-фосфатсинтаза (EPSP) і гени *aroA*. Див., наприклад, патент США № 4940835, виданий Shah et al., в якому розкрита нуклеотидна послідовність форми EPSPS, яка може надавати стійкість до гліфосату. У патенті США № 5627061, виданому Barry et al., також описані гени, що кодують ферменти EPSPS. Див. також патенти США №№ 6248876 B1; 6040497; 5804425; 5633435; 5145783; 4971908; 5312910; 5188642; 4940835; 5866775; 6225114 B1; 6130366; 5310667; 4535060; 4769061; 5633448; 5510471; Re. 36449; RE 37287 E та 5491288; і публікації міжнародних заявок WO 97/04103; WO 97/04114; WO 00/66746; WO 01/66704; WO 00/66747 і WO 00/66748, які включені в даний документ шляхом посилання з цією метою. Стійкість до гліфосату також надається рослинам, які експресують ген, що кодує фермент гліфосат-оксидоредуктазу, як докладніше описано в патентах США №№ 5776760 і 5463175, які включені в даний документ шляхом посилання з цією метою. Крім того, стійкість до гліфосату може надаватися рослинам шляхом надекспресії генів, що кодують гліфосат-N-ацетилтрансферазу. Див., наприклад, патент США №№ 7714188 і 7462481.

Гени, що становлять агрономічний інтерес і дозволені регуляторними органами, добре відомі фахівцю в даній галузі техніки та їх можна знайти на сайті Центра оцінки ризику для довкілля (cera-gmc.org/?action=gm_crop_database, доступ до якого можна одержати із застосуванням префіксу *www*) і на сайті Міжнародної служби зі збирання агробіотехнологічних застосунків (isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp, доступ до якого можна одержати із застосуванням префіксу *www*).

Екзогенні продукти включають рослинні ферменти та продукти, а також продукти з інших джерел, у тому числі прокаріотів та інших еукаріотів. Такі продукти включають ферменти, кофактори, гормони тощо.

Приклади інших застосовних генів і пов'язаного з ними фенотипу передбачають ген, що кодує білок вірусної оболонки та/або РНК, або інші гени вірусів або рослин, які надають стійкість до вірусів; гени, які надають стійкість до грибів; гени, що сприяють поліпшенню врожайності; та гени, що сприяють стійкості до стресових факторів, таких як холод, дегідратація, спричинена посухою, підвищена температура та засоленість, токсичні метали або слідові елементи тощо.

Як зазначено, гетерологічна нуклеотидна послідовність, функціонально пов'язана з регуляторним елементом LLDAV, розкритим у даному документі, може являти собою антисенсову послідовність цільового гена. Таким чином, промоторні послідовності, розкриті в даному документі, можуть бути функціонально пов'язані з антисенсовими послідовностями ДНК для зниження або інгібування експресії нативного білка в корені рослини.

"RNAi" відноситься до низки споріднених методик для зниження експресії генів (див., наприклад, патент США № 6506559). Нині вважають, що більш давні методики, що мають інші назви, засновані на тому ж механізмі, але в літературі вони називаються по-іншому. Вони включають "антисенсове інгібування", одержання транскриптів антисенсової РНК, які здатні супресувати експресію цільового білка, та "косупресію" або "сенсову супресію", що відноситься до одержання транскриптів сенсової РНК, які здатні супресувати експресію ідентичних або значною мірою подібних чужорідних або ендогенних генів (патент США № 5231020, який включено в даний документ шляхом посилання). Такі методики залежать від застосування конструкцій, що спричиняють накопичення дволанцюгової РНК, де один ланцюг є комплементарним цільовому гену, що піддається сайленсингу. Регуляторний елемент LLDAV згідно з варіантами здійснення можна застосовувати для запуску експресії конструкцій, що буде приводити до РНК-інтерференції за участі *microRNA* та *miRNA*.

Послідовності регуляторних елементів згідно з даним розкриттям або їхні варіанти або фрагменти, якщо функціонально пов'язані з гетерологічною нуклеотидною послідовністю, що

становить інтерес, можуть запускати конститутивну експресію гетерологічної нуклеотидної послідовності в рослині, що експресує цю конструкцію. "Гетерологічна нуклеотидна послідовність" являє собою послідовність, яка зазвичай не трапляється в природі разом з послідовністю регуляторного елемента згідно з даним розкриттям. Хоча ця нуклеотидна послідовність є гетерологічною щодо послідовності регуляторного елемента, вона може бути

гомологічною, або нативною, або гетерологічною, або чужорідною щодо рослини-хазяїна. Виділені послідовності регуляторного елемента згідно з даним розкриттям можна модифікувати із забезпеченням діапазону рівнів експресії гетерологічної нуклеотидної послідовності. Таким чином, можна використовувати ділянку, меншу ніж ціла ділянка регуляторного елемента, та при цьому зберігається здатність запускати експресію нуклеотидної послідовності, що становить інтерес. Вважається, що рівні експресії mRNA можна змінювати різними шляхами за допомогою делецій частин послідовностей регуляторних елементів. Рівні експресії mRNA можуть знижуватися, або, альтернативно, експресія може підвищуватися внаслідок делецій регуляторного елемента, наприклад, якщо існує негативний регуляторний елемент (для репресора), що видаляється під час процесу усікання. Як правило, щонайменше приблизно 20 нуклеотидів виділеної послідовності регуляторного елемента застосовуватимуться для запуску експресії нуклеотидної послідовності.

Вважається, що для збільшення рівнів транскрипції, в комбінації з ділянками регуляторних елементів згідно з даним розкриттям можна використовувати енхансери. Енхансери являють собою нуклеотидні послідовності, які ведуть до підвищення рівня експресії, що забезпечується ділянкою регуляторного елемента. Енхансери відомі з рівня техніки та включають енхансерну ділянку SV40, енхансерний елемент 35S тощо. Також відомо, що деякі енхансери змінюють нормальні профілі експресії під контролем регуляторного елемента, наприклад, обумовлюючи керування регуляторним елементом конститутивної експресії при відсутності енхансера, тоді як цей же регуляторний елемент керує експресією тільки в одній певній тканині або декількох певних тканинах.

Модифікації виділених послідовностей регуляторних елементів згідно з даним розкриттям можуть забезпечувати діапазон експресії гетерологічної нуклеотидної послідовності. Таким чином, їх можна модифікувати так, аби вони були слабкими промоторами або сильними промоторами. Як правило, "слабкий промотор" означає, що промотор запускає експресію кодуючої послідовності на низькому рівні. Передбачається, що "низький рівень" експресії означає експресію на рівнях від приблизно 1/10000 транскриптів до приблизно 1/100000 транскриптів, до приблизно 1/500000 транскриптів. Навпаки, сильний промотор запускає експресію кодуючої послідовності на високому рівні, або від приблизно 1/10 транскриптів до приблизно 1/100 транскриптів, або до приблизно 1/1000 транскриптів.

Вважається, що регуляторні елементи LLDAV згідно з даним розкриттям можна застосовувати для підвищення або зменшення експресії, що, таким чином, веде до зміни фенотипу трансформованої рослини. Ця фенотипічна зміна може в подальшому впливати на збільшення або зменшення рівнів іонів металів у тканинах трансформованої рослини.

Нуклеотидні послідовності, розкриті в даному розкритті, а також їхні варіанти та фрагменти, є придатними для генетичної маніпуляції з рослиною. Послідовність регуляторного елемента LLDAV є придатною в даному аспекті, якщо вона функціонально пов'язана з гетерологічною нуклеотидною послідовністю, експресію якої мають регулювати для досягнення потрібної фенотипічної відповіді. Термін "функціонально пов'язаний" означає, що послідовність регуляторного елемента впливає на транскрипцію або трансляцію гетерологічної нуклеотидної послідовності. Таким чином, нуклеотидні послідовності регуляторних елементів згідно з даним розкриттям можуть бути забезпечені в касетах експресії разом з гетерологічними нуклеотидними послідовностями, що становлять інтерес, для експресії в рослині, що становить інтерес, більш конкретно для експресії в корені рослини.

Регуляторні послідовності згідно з варіантами здійснення забезпечені в ДНК-конструкціях для експресії в організмі, що становить інтерес. "Касета експресії", як застосовується в даному документі, означає ДНК-конструкцію, що містить регуляторну послідовність згідно з варіантами здійснення, функціонально пов'язану з гетерологічним полінуклеотидом, що кодує поліпептид, який становить інтерес. Такі касети експресії будуть містити ділянку ініціації транскрипції, що містить одну з нуклеотидних послідовностей регуляторного елемента згідно з даним розкриттям або його варіанти або фрагменти, функціонально пов'язані з гетерологічною нуклеотидною послідовністю. Таку касету експресії можна забезпечувати різними сайтами рестрикції для вставки нуклеотидної послідовності, щоб вона перебувала під транскрипційною регуляцією, що забезпечують регуляторні ділянки. Касета експресії може додатково містити гени селективних маркерів, а також 3'-ділянки термінації.

Касета експресії може містити, в 5'-3' напрямку транскрипції, ділянку ініціації транскрипції (тобто промотор або його варіант або фрагмент згідно з даним розкриттям), ділянку ініціації трансляції, гетерологічну нуклеотидну послідовність, що становить інтерес, ділянку термінації трансляції та необов'язково ділянку термінації транскрипції, які функціонують в організмі хазяїна

5 Регуляторні ділянки (тобто промотори, транскрипційні регуляторні ділянки та ділянки термінації трансляції) та/або полінуклеотид згідно з варіантами здійснення можуть бути нативними/аналогічними щодо клітини-хазяїна або одна до одної. Альтернативно, регуляторні ділянки та/або полінуклеотид згідно з варіантами здійснення можуть бути гетерологічними щодо клітини-хазяїна або одна до одної. Як застосовується в даному документі, термін

10 "гетерологічна" щодо послідовності означає, що послідовність походить з чужорідного виду або, якщо вона походить з того самого виду, значною мірою модифікована за складом та/або місцезонаштуванням у геномі порівняно з її нативною формою внаслідок навмисного втручання людини. Наприклад, промотор, функціонально пов'язаний з гетерологічним полінуклеотидом, походить від виду, відмінного від виду, з якого одержаний полінуклеотид, або, якщо він

15 походить з того самого/аналогічного виду, то один або обидва з них є значною мірою модифікованими порівняно з їхньою вихідною формою та/або місцезонаштуванням у геномі, або промотор не є нативним промотором для функціонально пов'язаного полінуклеотиду.

Ділянка термінації може бути нативною щодо ділянки ініціації транскрипції, може бути нативною щодо функціонально пов'язаної послідовності ДНК, що становить інтерес, може бути нативною щодо рослини-хазяїна або може бути одержана з іншого джерела (тобто чужорідного або гетерологічного щодо промотора, послідовності ДНК, що експресується, рослини-хазяїна або будь-якої їхньої комбінації). Придатні ділянки термінації доступні від Ті-плазмиди *A. tumefaciens*, такі як ділянки термінації генів октопінсинтази та нопалінсинтази. Див. також

20 Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; та Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

Касета експресії, що містить послідовності згідно з даним розкриттям, може також містити щонайменше одну додаткову нуклеотидну послідовність гена, який підлягає котрансформації в організм. Альтернативно, додаткова послідовність(послідовності) може бути представлена в іншій касеті експресії.

30

За необхідності, нуклеотидні послідовності, експресія яких має перебувати під керуванням послідовності конститутивного промотора згідно з даним розкриттям, та будь-яка додаткова нуклеотидна послідовність(послідовності) можуть бути оптимізовані для підвищеної експресії в трансформованій рослині. Тобто ці нуклеотидні послідовності можна синтезувати із застосуванням кодонів, переважних для рослини, для поліпшення експресії. Див., наприклад,

35 Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 для обговорення переважної для хазяїна частоти застосування кодонів. З рівня техніки доступні способи синтезу генів, переважних для рослин. Див., наприклад, патенти США №№ 5380831, 5436391 та Murray et al. (1989) *Nucleic*

40 *Acids Res.* 17:477-498, включені в даний документ шляхом посилання.

Відомі додаткові модифікації послідовності для посилення експресії гена в клітині-хазяїні. Вони включають вилучення послідовностей, що кодують хибні сигнали поліаденілювання, сигнали сайту екзон-інтронного сплайсингу, транспозоноподібні повтори та інші такі добре вивчені послідовності, які можуть здійснювати шкідливий вплив на експресію гена. Вміст G-C в гетерологічній нуклеотидній послідовності можна коригувати до рівнів, середніх для даної клітини-хазяїна, як розраховано відносно відомих генів, що експресуються в клітині-хазяїні. Якщо можливо, послідовність модифікують для запобігання утворенню передбачених шпилькових вторинних структур mRNA.

45

Касети експресії можуть додатково містити 5'-лідерні послідовності. Такі лідерні послідовності можуть сприяти підсиленню трансляції. Лідерні послідовності трансляції відомі з рівня техніки та передбачають лідерні послідовності пікорнавірусів, наприклад, лідерну послідовність EMCV (5'-некодуюча ділянка вірусу енцефаломіокардиту) (Elroy Stein, et al. (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:6126-6130); лідерні послідовності потивірусів, наприклад, лідерну послідовність TEV (вірусу гравіювання тютюну) (Allison et al. (1986) *Virology* 154:9 20); лідерну послідовність MDMV (вірусу карликової мозаїки кукурудзи); білка, який зв'язує важкий ланцюг імуноглобуліну людини (BiP) (Masejak, et al. (1991) *Nature* 353:90 94); лідерну послідовність з mRNA білка оболонки вірусу мозаїки люцерни, що не транслюється (AMV RNA 4) (Jobling et al. (1987) *Nature* 325:622 625); лідерну послідовність вірусу тютюнової мозаїки (TMV) (Gallie et al. (1989) *Molecular Biology of RNA*, pages 237 256) і лідерну послідовність вірусу хлорозної мозаїчності маїсу (MCMV) (Lommel et al. (1991) *Virology* 81:382 385). Див. також Della Cioppa et

50

55

60

al. (1987) *Plant Physiology* 84:965-968. Також можна використовувати відомі способи підсилення стабільності mRNA, наприклад, інтрони, такі як убівітиновий інтрон maісу (Christensen and Quail (1996) *Transgenic Res.* 5:213-218; Christensen et al. (1992) *Plant Molecular Biology* 18:675-689) або інтрон maісу Adh1 (Kyoзuka et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 228:40-48; Kyoзuka et al. (1990) *Maydica* 35:353-357) тощо.

Під час одержання касети експресії різними фрагментами ДНК можна маніпулювати так, щоб одержати послідовності ДНК у належній орієнтації та, за необхідності, в належній рамці зчитування. З цією метою для з'єднання фрагментів ДНК можна використовувати адаптери або лінкери або можна залучати інші маніпуляції для забезпечення прийнятних сайтів рестрикції, видалення надлишкової ДНК, видалення сайтів рестрикції тощо. Для цього можна залучати мутагенез *in vitro*, репарацію за допомогою праймерів, рестрикцію, гібридизацію, повторні заміщення, наприклад, транзиції та трансверсії.

До касет експресії можна вводити репортерні гени або гени селективного маркера. Приклади придатних репортерних генів, відомих з рівня техніки, можна знайти, наприклад, у Jefferson et al. (1991) в *Plant Molecular Biology Manual*, ed. Gelvin et al. (Kluwer Academic Publishers), pp. 1-33; DeWet et al. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:725-737; Goff et al. (1990) *EMBO J.* 9:2517-2522; Kain et al. (1995) *BioTechniques* 19:650-655; та Chiu et al. (1996) *Current Biology* 6:325-330.

Гени селективного маркера для відбору трансформованих клітин або тканин можуть включати гени, які надають стійкість до антибіотиків або стійкість до гербіцидів. Приклади придатних генів селективних маркерів включають без обмеження гени, що кодують стійкість до хлорамфеніколу (Herrera Estrella et al. (1983) *EMBO J.* 2:987-992); метотрексату (Herrera Estrella et al. (1983) *Nature* 303:209-213; Meijer et al. (1991) *Plant Mol. Biol.* 16:807-820); гірпоміцину (Waldron et al. (1985) *Plant Mol. Biol.* 5:103-108 та Zhijian et al. (1995) *Plant Science* 108:219-227); стрептоміцину (Jones et al. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210:86-91); спектиноміцину (Bretagne-Sagnard et al. (1996) *Transgenic Res.* 5:131-137); блеоміцину (Hille et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 7:171-176); сульфонамідів (Guerineau et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:127-136); бромоксінілу (Stalker et al. (1988) *Science* 242:419-423); гліфосату (Shaw et al. (1986) *Science* 233:478-481 та патентні заявки США з серійними номерами 10/004357 та 10/427692); фосфінотрицину (DeBlock et al. (1987) *EMBO J.* 6:2513-2518).

Інші гени, які можна застосовувати в одержанні трансгенних об'єктів, але які можуть бути непотрібними в кінцевому продукті, будуть включати без обмеження такі приклади, як GUS (бета-глюкуронідаза; Jefferson (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387), GFP (зелений флуоресцентний білок; Chalfie et al. (1994) *Science* 263:802), люцифераза (Riggs et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15(19):8115 та Luehrsen et al. (1992) *Methods Enzymol.* 216:397-414) та гени maісу, що кодують продукування антоціаніну (Ludwig et al. (1990) *Science* 247:449).

Касету експресії, що містить регуляторні елементи LLDV згідно з даним розкриттям, функціонально пов'язані з нуклеотидною послідовністю, що становить інтерес, можна застосовувати для трансформації будь-якої рослини. У такий спосіб можна одержувати генетично модифіковані рослини, рослинні клітини, рослинні тканини, насіння, корінь тощо.

Способи згідно з даним розкриттям передбачають введення поліпептиду або полінуклеотиду в рослину. Передбачається, що "введення" означає надання рослині полінуклеотиду або поліпептиду у такий спосіб, щоб послідовність потрапила всередину клітини рослини. Способи згідно з даним розкриттям не залежать від конкретного способу введення послідовності в рослину, за винятком того, що полінуклеотид або поліпептиди потрапляють всередину щонайменше однієї клітини рослини. З рівня техніки відомі способи введення полінуклеотиду та/або поліпептидів у рослини, в тому числі без обмежень способи стабільної трансформації, способи тимчасової трансформації та способи трансформації, опосередкованої вірусами.

Передбачається, що "стабільна трансформація" означає, що нуклеотидна конструкція, що введена в рослину, інтегрується в геном рослини та може успадковуватися її потомством. Передбачається, що "тимчасова трансформація" означає, що полінуклеотид вводиться в рослину та не інтегрується в геном рослини, або в рослину вводиться поліпептид.

Протоколи трансформації, а також протоколи для введення нуклеотидних послідовностей в рослини можна змінювати залежно від типу рослини або рослинної клітини, тобто однодольної або дводольної рослини, що призначена для трансформації. Придатні способи введення нуклеотидних послідовностей в рослинні клітини та подальшої вставки в геном рослини включають мікроін'єкцію (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4:320334), електропорацію (Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:56025606), трансформацію, опосередковану *Agrobacterium* (патенти США №№ 5563055 і 5981840), пряме перенесення генів (Paszkowski et

al. (1984) EMBO J. 3:27172722) та балістичне прискорення частинок (див., наприклад, патенти США №№ 4945050; 5879918; 5886244 і 5932782; Tomes et al. (1995) в Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, ed. Gamborg and Phillips, (Springer-Verlag, Berlin); McCabe et al. (1988) Biotechnology 6:923926) і трансформацію Lec1 (WO 00/28058). Див. також Weissinger et al. (1988) Ann. Rev. Genet. 22:421 477; Sanford et al. (1987) Particulate Science and Technology 5:27 37 (цибуля); Christou et al. (1988) Plant Physiol. 87:671 674 (соя); McCabe et al. (1988) Bio/Technology 6:923 926 (соє); Finer and McMullen (1991) In Vitro Cell Dev. Biol. 27P:175-182 (соє); Singh et al. (1998) Theor Appl. Genet. 96:319-324 (соє); Datta et al. (1990) Biotechnology 8:736 740 (рис); Klein et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4305 4309 (маїс); Klein et al. (1988) Biotechnology 6:559 563 (маїс); патенти США №№ 5240855; 5322783 і 5324646; Klein et al. (1988) Plant Physiol. 91:440 444 (маїс); Fromm et al. (1990) Biotechnology 8:833 839 (маїс); Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) Nature (London) 311:763-764; патент США № 5736369 (злакові рослини); Bytebier et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5345-5349 (Liliaceae); De Wet et al. (1985) в Experimental Manipulation of Ovule Tissues, ed. Chapman et al. (Longman, New York), pp. 197-209 (пилло); Каепплер et al. (1990) Plant Cell Reports 9:415-418 та Каепплер et al. (1992) Theor Appl. Genet. 84:560-566 (трансформація, опосередкована віскерами); D'Halluin et al. (1992) Plant Cell 4:1495-1505 (електропорація); Li et al. (1993) Plant Cell Reports 12:250-255 та Christou and Ford, (1995) Annals of Botany 75:407-413 (рис); Osjoda et al. (1996) Nature Biotechnology 14:745-750 (трансформація маїсу за допомогою Agrobacterium tumefaciens); усі з яких включено в даний документ шляхом посилання.

У визначених варіантах здійснення ДНК-конструкції, що містять послідовності регуляторних елементів згідно з даним розкриттям, можна вводити в рослину із застосуванням низки способів тимчасової трансформації. Такі способи тимчасової трансформації включають без обмеження системи на основі вірусних векторів та осадження полінуклеотиду в такий спосіб, що виключає подальше вивільнення ДНК. Таким чином, може відбуватися транскрипція ДНК, зв'язаної на частинках, але частота, з якою вона вивільнюється, щоб інтегруватися в геном, значно знижена. Такі способи включають застосування частинок, вкритих поліетиленіміном (PEI; Sigma-Aldrich™ № P3143).

В інших варіантах здійснення полінуклеотид згідно з даним розкриттям можна вводити в рослини шляхом приведення рослин у контакт з вірусом або вірусними нуклеїновими кислотами. Загалом, такі способи передбачають вбудовування нуклеотидної конструкції згідно з даним розкриттям в молекулу вірусної ДНК або РНК. Способи введення в рослини полінуклеотидів, у тому числі молекул вірусної ДНК або РНК, та способи експресії білка, що закодований у них, відомі з рівня техніки. Див., наприклад, патенти США №№ 5889191, 5889190, 5866785, 5589367, 5316931 та Porta et al. (1996) Molecular Biotechnology 5:209-221; включені в даний документ шляхом посилання.

З рівня техніки відомі способи цілеспрямованої вставки полінуклеотиду у визначене місцерозташування в геномі рослини. В одному варіанті здійснення вставку полінуклеотиду в потрібне місцерозташування в геномі здійснюють із застосуванням системи сайт-специфічної рекомбінації. Див., наприклад, WO99/25821, WO99/25854, WO99/25840, WO99/25855 і WO99/25853, усі з яких включено в даний документ шляхом посилання. Коротко, полінуклеотид згідно з даним розкриттям може міститися в касеті для перенесення, фланкованій двома неідентичними сайтами рекомбінації. Касету для перенесення вводять у рослину, що має у своєму геномі стабільно вбудований цільовий сайт, фланкований двома неідентичними сайтами рекомбінації, які відповідають сайтам касети для перенесення. Забезпечують відповідну рекомбіназу, та касета для перенесення інтегрується в цільовий сайт. Полінуклеотид, що становить інтерес, таким чином, інтегрується у визначене хромосомне положення в геномі рослини.

З клітин, які були трансформовані, можна вирощувати рослини згідно з традиційними способами. Див., наприклад, McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84. Потім ці рослини можна вирощувати, та піддавати запиленню або із застосуванням тієї самої трансформованої лінії, або із застосуванням інших ліній, та ідентифікувати одержаний гібрид, що характеризується конститутивною експресією бажаної фенотипічної характеристики. Можна вирощувати два або більше поколінь, аби переконатися, що експресія бажаної фенотипічної характеристики стабільно підтримується та успадковується, а потім збирати насіння, аби переконатися, що була досягнута експресія бажаної фенотипічної характеристики. Таким чином, дане розкриття передбачає трансформоване насіння (що також називають "трансгенне насіння"), що містить нуклеотидну конструкцію згідно з даним розкриттям, наприклад, касету експресії згідно з даним розкриттям, стабільно вбудовану в його геном.

Форма однини застосовується в даному документі для позначення одного або декількох

(тобто щонайменше одного) граматичних об'єктів предмета. Наприклад, "елемент" означає один або декілька елементів.

Буде зрозумілим, що упродовж усієї заявки слово "що містить" або варіанти, такі як "містить" або "який містить", припускає включення наведеного елемента, цілого числа або стадії, або групи елементів, цілих чисел або стадій, а не виключення будь-якого іншого елемента, цілого числа або стадії, або групи елементів, цілих чисел або стадій.

Усі публікації, патенти та заявки на патент, згадані в даному описі, орієнтовані на рівень фахівців в галузі техніки, до якої належить дане розкриття. Усі публікації, патенти та заявки на патент включені в даний документ шляхом посилання такою ж мірою, як якби кожна окрема публікація, патент або заявка на патент була спеціально та окремо включена шляхом посилання.

Передбачається, що вищенаведений опис різних ілюстративних варіантів здійснення даного розкриття не є вичерпним або обмежує обсяг точної форми, що розкрита. Хоча конкретні варіанти здійснення прикладів описані у даному документі для ілюстративних цілей, у межах обсягу даного розкриття можливі різні еквівалентні модифікації, як буде зрозуміло фахівцям у даній галузі. Представленні в даному документі ідеї можна застосовувати для інших цілей, відмінних від прикладів, описаних вище. У світлі вищенаведених ідей можливі численні модифікації та зміни, і тому вони входять у межі обсягу формули винаходу, що додається.

Ці та інші зміни можуть бути виконані у світлі вищенаведеного детального опису. Загалом, у нижченаведених формулі винаходу, використовувані терміни не повинні тлумачитись як такі, що обмежують обсяг конкретних варіантів здійснення, розкритих в описі та формулі винаходу.

Були здійснені спроби забезпечення точності щодо застосовуваних чисел (наприклад, кількості, температури, концентрації тощо), проте можуть передбачатися деякі експериментальні помилки та відхилення. Якщо не вказано інакше, частини являють собою частини за вагою, молекулярна вага являє собою середню молекулярну вагу; температура наведена в градусах за Цельсієм та тиск є атмосферним або близьким до атмосферного.

Наступні приклади представлені для ілюстрування, а не для обмеження.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Приклад 1. Послідовності регуляторних елементів вірусу, що викликає деформацію листя глухої кропиви

Регуляторний елемент з SEQ ID NO: 1 одержували шляхом пошуку серед геномів у GenBank стосовно вірусних геномів, які були секвеновані та належали до родини вірусів Caulimoviridae. Пошук розпочинали на основі добре відомого 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV35S). Він запускає конститутивну експресію гетерологічних генів у більшості тканин більшості рослин. Інші регуляторні елементи з цієї родини вірусів, такі як 34S промотор вірусу мозаїки ранника, також керують експресією, подібною до конститутивної, у рослинах. Отже, додаткові регуляторні елементи, що походять від родини вірусів Caulimoviridae, також можуть запустити конститутивну експресію в рослинах. Ділянка геному, що знайдена в так званій довгій міжгенній ділянці (LIR), зазвичай містить регуляторні послідовності, необхідні для функціонування промотора в рослинах.

Геном вірусу, що викликає деформацію листя глухої кропиви (LLDAV), містить LIR, отже на цю ділянку здійснювали цілеспрямований вплив задля функціонального аналізу регуляторних елементів. Одну повнорозмірну послідовність відбирали для тестування в рослинах. Послідовність складалась із 1226 п. о. (викладена в SEQ ID NO: 1) та містила припустимий TATA-бокс, що розпочинався на приблизно 95 п. о. вище від 3'-кінця послідовності. Повна послідовність з 1226 п. о. відноситься до повнорозмірного регуляторного елемента LLDAV або LLDAV FL. За допомогою делеції сегментів з 5'-кінця повнорозмірного регуляторного елемента можна змінити профіль експресії та отримати більш повне уявлення щодо важливих маркерів послідовності в регуляторній ділянці. Друга, третя, четверта, п'ята та шоста послідовності являють собою усічені варіанти повнорозмірного регуляторного елемента (див. фігуру 2; SEQ ID NO: 1). Регуляторні елементи LLDAV TR1, LLDAV TR2, LLDAV TR3, LLDAV TR4 та LLDAV TR5 відповідно складаються з 1130 п. о., 904 п. о., 885 п. о., 443 п. о. та 113 п. о. та містять 3'-кінець повнорозмірного промотора (SEQ ID NO: 2-6).

Приклад 2. Аналіз експресії та делеційний аналіз щодо регуляторного елемента LLDAV

LLDAV FL функціонально пов'язували з першим інтроном гену алкогольдегідрогенази 1 (ADH1 інтрон 1) маїсу та геном β-глюкуронідази (GUS) у векторі експресії для дослідження, чи буде синтезований фрагмент ДНК керувати експресією (SEQ ID NO: 1). Інтрон 1 ADH1 включали з метою підвищення рівня експресії, оскільки із застосуванням клітин злакових рослин було показано, що експресія трансгенів збільшується у разі наявності деяких 5'-проксимальних інтронів (див. Callis et al. (1987) Genes and Development 1: 1183-1200; Kyoizuka et al. (1990)

Maydica 35:353-357).

Промотор Ubi-1 та інтрон із Zea mays функціонально пов'язували з геном GUS так, щоб його можна було застосовувати для порівняння профілю експресії та рівнів експресії під контролем регуляторних елементів LLDV. Промотор Ubi-1 являє собою сильний конститутивний промотор у більшості тканин Zea mays.

Регуляторні елементи являють собою набір мотивів послідовності, які функціонують разом для зв'язування факторів транскрипції, що обумовлює просторові, часові та кількісні характеристики експресії промотора. Розуміння структури та розміщення цих мотивів розширює інформацію щодо регуляторного елемента. Аналіз підданих делеції сегментів являє собою важливий інструмент, який можна застосовувати для початку ідентифікації ділянок регуляторного елемента, що містить функціонально важливі мотиви. Шляхом видалення сегментів з 5'-кінця можна змінювати просторові, часові та/або кількісні профілі експресії, що керується регуляторним елементом. Ділянки, що приводять до зміни, можна далі вивчати більш детально для оцінки послідовностей та їх взаємодії з цис- і транс-активувальними факторами. Усічення також можуть визначати мінімальну функціональну послідовність.

Сайти розпізнавання рестрикційної ендонуклеази SfuI, AclI, SacI, EcoRI та ClaI застосовували для видалення п'яти ділянок послідовності LLDV FL, розмір яких знаходився в діапазоні від ~96 до 1113 п. о. LLDV TR1, LLDV TR2, LLDV TR3, LLDV TR4, LLDV TR5 функціонально пов'язували з інтроном 1 ADH1 та геном GUS у векторі експресії для дослідження потенціалу експресії з використанням синтезованих фрагментів ДНК (SEQ ID NO: 2-6).

Стабільно трансформовані рослини маїсу створювали за допомогою протоколів із застосуванням Agrobacterium (детально в прикладі 3) для забезпечення можливості визначення характеристик активності промотора, у тому числі просторових та кількісних характеристик експресії, що керується різними регуляторними елементами. З рослин, що виростили до стадії V5/6 в тепличних умовах, збирали матеріал у вигляді листя та коріння для оцінки змін профілю експресії за допомогою аналізу гістохімічного фарбування на активність GUS та кількісних флуориметричних аналізів. Стадії вегетативного росту маїсу визначали за числом листкових вузлів у рослині. Таким чином, рослина на стадії V5 мала 5 сформованих листкових вузлів. Тканини також збирали, коли рослини досягали стадії генеративного розвитку R1-R2. R1 відзначали появою шовковистих ниткоподібних маточок поза листковою обгорткою, а R2 коли шовковисті ниткоподібні маточки починали висихати. Результати продемонстрували, що LLDV FL керував експресією в більшості тканин маїсу подібно до промотору Ubi-1 або трошки краще за нього (таблиця 1). Винятком був пилок, в якому експресія під керуванням LLDV FL була набагато нижчою, ніж під керуванням Ubi-1. 5'-усічені промотори (LLDV TR1-4) вели себе подібно до LLDV FL за винятком LLDV TR5, який не функціонував ні в одній із досліджуваних тканин.

Таблиця 1

Результати експресії для промотора LLDV (з інтроном 1 ADH1 та GUS) в рослині

	V5-V6			R1-R2			
	Листок	Корінь	Стебло	Волоть	Листкова обгортка	Шовковисті ниткоподібні маточки	Пилок
LLDV FL	4	3	3	3	5	2	<0,1
LLDV TR1	4	3	3	3	5	2	<0,1
LLDV TR2	4	3	3	3	5	2	<0,1
LLDV TR3	4	3,5	3,25	3	5	2	<0,1
LLDV TR4	4	3	3	3	5	2	<0,1
LLDV TR5	0	0	0	0	0	0	0
Ubi-1	3	3	3	3	5	2	3
Без трансформації (негативний контроль)	0	0	0	0	0	0	0

Дані виражені за допомогою шкали від 0 до 6, при цьому промотор Ubi-1 маїсу, що керував експресією, був порівняльним зразком.

Регуляторний елемент LLDV FL (SEQ ID NO: 1) функціонально пов'язували з інтроном 1 ADH1 та інсектицидним геном (скорочено IG2) для дослідження експресії. Промотор Ubi-1 та інтрон, що керують експресією інсектицидного гена IG2, застосовували в аналізі для порівняння. Стабільно трансформовані рослини маїсу створювали за допомогою протоколів із застосуванням *Agrobacterium* (детально в прикладі 3) та залишали їх рости до стадії V5/6, під час якої збирали листя. Потім рослини залишали рости до стадій R1-R2, під час яких брали зразки стебла та пилку. Зерна відбирали для зразків після їх дозрівання.

Результати твердофазних імуоферментних аналізів (ELISA) щодо IG2 продемонстрували, що регуляторний елемент LLDV FL (SEQ ID NO: 1) керував експресією у тканинах листка, стебла та зерна (таблиця 2). Рівні експресії були порівнювані з промотором Ubi-1 та його інтроном у тканинах листка та стебла. У зернах експресія, керована LLDV FL (SEQ ID NO: 1), була нижчою порівняно з Ubi-1, а у пилку експресія була дуже низькою.

Дані щодо експресії підкріплювались результатами аналізів щодо поїдання комахами. Поїдання комахами нарізаних тканин рослини забезпечувало швидку оцінку експресії білка, так як для захисту тканини від комах необхідними були достатні її рівні. Недостатня експресія буде приводити до ушкодження від поїдання. Як рослини, що мали LLDV FL (SEQ ID NO: 1), так і рослини, що мали Ubi-1, характеризувались рівнями експресії, що забезпечували захист тканини листка та шовковистих ниткоподібних маточок від пошкодження комахами. Тканини рослин негативного контролю, що не мали гена IG2, були з'їдені.

Дані виражені за допомогою шкали від 0 до 6, при цьому промотор Ubi-1 маїсу представляє медіанне значення.

Таблиця 2

Результати експресії для регуляторного елемента LLDV (з інтроном 1 ADH1 та LLDV:IG2) в рослині

	V5-V6	R1-R2		Стиглість
	Листок	Стебло	Пилка	Зерна
LLDV FL	2	3	<0,1	<0,75
Ubi-1	2	3	3	2
Без трансформації (негативний контроль)	0	0	0	0

Дані виражені за допомогою шкали від 0 до 6, при цьому промотор Ubi-1 маїсу представляє медіанне значення.

Приклад 3. Трансформація маїсу, опосередкована *Agrobacterium*, та регенерація трансгенних рослин

Для трансформації маїсу, опосередкованої *Agrobacterium*, із застосуванням послідовності регуляторного елемента згідно з даним розкриттям, застосовували спосіб за Zhao (патент США № 5981840 та РСТ публікація патентної заявки WO98/32326; вміст яких, цим включено в даний документ шляхом посилання). Коротко, незрілі зародки виділяли з маїсу та зародки приводили в контакт з суспензією *Agrobacterium* в умовах, за яких бактерії були здатними переносити послідовність регуляторного елемента згідно з даним розкриттям щонайменше в одну клітину щонайменше одного з незрілих зародків (стадія 1: стадія інфікування). Зародки спільно культивували із суспензією *Agrobacterium* протягом певного періоду часу, потім спільно культивували на твердому середовищі (стадія 2: стадія спільного культивування). Після спільного культивування проводили необов'язкову стадію "спокою". На цій стадії спокою зародки інкубували в присутності щонайменше одного антибіотика, який, як відомо, інгібує ріст *Agrobacterium*, без додавання селективного засобу для рослинних трансформантів (стадія 3: стадія спокою). Потім зародки переносили та культивували на середовищі, що містило селективний засіб, для виділення зростаючих трансформованих калюсів (стадія 4: стадія відбору). Проростки регенерували із калюсів (стадія 5: стадія регенерації), перед тим як перенести їх у теплицю.

Приклад 4. Аналіз експресії під контролем регуляторного елемента LLDV в канолі

Промотор LLDV досліджували у канолі із застосуванням гену GUS як репортерного. Аналізи транз'єнтної експресії, опосередкованої біолістичним бомбардуванням, застосовували для забезпечення початкової оцінки ефективності. Кількість пофарбованих осередків GUS та інтенсивність фарбування порівнювали з промотором убіквітину-10 *Arabidopsis* (AtUBQ10), сильним промотором у тканинах канолі. Ефективність промотора LLDV була подібною з

ефективністю промотора AtUBQ10 щодо інтенсивності фарбування GUS. Однак спостерігали невелике зниження кількості пофарбованих осередків (таблиця 3).

5 Трансгенні рослини канолі регенерували за допомогою обидвох векторів LLDV:GUS та AtUBQ10:GUS. За допомогою гістохімічного фарбування трансформантів LLDV:GUS було виявлено високі рівні експресії у листках та частинах квітки (таблиця 3). Експресію, що керувалась LLDV, також спостерігали в пилку та стручках. У разі порівняння із гістохімічно пофарбованою тканиною рослин, трансформованих AtUBQ10:GUS, LLDV був порівнюваним у листках та частинах квітки. У пилку експресія, що керувалась LLDV, була слабшою порівняно з AtUBQ10, при цьому пофарбованими були приблизно 10-15% пилкових зерен. Майже всі
10 пилкові зерна AtUBQ10 фарбувались у темний колір.

Таблиця 3

Результати експресії для промотора LLDV у канолі

	Аналіз транзйентної експресії	Листок	Частини квітки	Пилок
LLDV FL	2	3	3	1
AtUBQ10	3	3	3	3

Дані виражені за допомогою шкали від 0 до 3, при цьому трійка означала сильну експресію.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- <116> ПІОНІР ХАЙ-БРЕД ІНТЕРНЕШНЛ
ДІН, Скет
ВАН АЛЕН, Мішель
ЛУ, Алберт
- <120> Регуляторні елементи рослин та способи їхнього застосування
- <130> 597005P3P
- <160> 6
- <170> ParentIn версія 3.5
- <210> 1
- <211> 1226
- <212> ДНК
- <213> Вірус, що викликає деформацію листя пшухої хрениви
- <220>
- <221> промотор
- <222> (1)..(1226)
- <223> Послідовність промотора LLDAY FL
- <400> 1
octacgtttt taaggattat tatgttgttt ttaatgggtcc tcttccaggt acctatacca
60

attggcctgc agcacagcaa gctacgaaga atgtttcgaa tgttctacac aagaatatca
120

aaggcttcac agaagcaaga acggcgggag atttatactg caaaaatcat gggtttagaac
180

ctctcaagtt ctattctgaa gaagctactc ttcaacccaa gcagcctaaa agaaaagttc
240

caterggcga actaccagc tcttctctca aagaagctga tacaaccagat gtaaacattg
300

tcatggaaga cticatgaat gtctacaagg ctgcaagagc tcatttaagat gaacgattct
360

tcctcgacca ctctctcacc accgagaaga aaaaatctaag cttttacaat tctgtgtaat
420

gttcagatcc tgagatcgta aaagatgcct atctttgttg attgatcaa acaactctcc
480

caggctctaa tctcttgag atttctctcc ttcttaaga gataagaaga aaggtcaagc
540

tattcagacg aaagtgcatt aaagatccaa gaaagaaat ttacttgaaa tcttccagca
600

ctattccag atggggaaaa gaaggtagaa aggtttactg gccacatcac catataacta
660

tgggtgttccg ttccgaagaa gaacaatacc agccttccag acaaatggaa gccacacttg
720

aggttcaaga ccttgaagaa ctacgtgttc aaaaaattcc acagttcacc gaaaagaigt
760

ttgaattcag caaggaagat tagacatttg tcaatcttat ctggaatagg gttttgataa
840

cttcaaaaac ttcaaacca ctacagcaca gccatgggga attgattctt ctttttcaaa
900

agaggttaaa gaatcattat gactttggac cccaccatcc actcataatc aaaagcatag
960

agaaaaagtc agtggaaatc agctgcctca actgtagcaa aggcaaaaag ccaaaagaaag
1020

acggaaacgt agaagattct gcgacaacgt cgtcatcacc cagctaattg agttaagtgt
1080

tgaattcgta gccatgaagt aaacattttg tatcgatccr cactccttat ctataaaagg
1140

ttgaattatt ttctttgaa ggcacatctg aaactagcag tctctctctt tcaaaaaatt
1200

tatcttttta agtttttagt cgtcgt
1226

<210> 2

<211> 1130

<212> ДНК

<213> Вірус, що викликає деформацію листя рпухої кропиви

<220>

<221> промотор

<222> (1) .. (1130)

<223> Носійловність промотора LLDAY TRI

<400> 2

cgaatgttct acacaagaaa tacaaagget tcatagaagt aagaacggcg gcagatttat
60

actgcacaaa tcatgggtta gaacctctca agttctattc tgaagaagct actcttcaac
120

ccaagcagcc taaaagaaaa gtccatccg gcgaactacc cagctcttct cccaaagaag
180

ctgatacacc agatgtaaac attgtcatgg aagacttcac gaatgtctac aaggctgcaa
240

gagctcatta agatgaacga ttcttcateg accattcttt caccaccgag aagaaaaatc
300

taagcttcta caatttctgt gaatgttcag atcttgagat cgtaaaagat gcctatcttt
360

gtggattgat caaaaacaatc taccoaggtc ctaattctct ggagatttct ctcttctcta
420

aagagataag aagaaatgtc aagctattca gacgaaagtg cattaaagat ccaagtaaga
480

aaatttactt gaatttcttc agcaattctc ccagatgggg aaaagaaggt gaacagggtt
540

actggccaca taccatata actatgggtg ttggttccga agaagaaaca taccagcctt
600

ccagacaaat ggaagccaca cttgaggttc aagaacttga agaactagct gttcaaaaaa
660

tloaacagtt catcgaaaag atgtttgaat tcagcaagga agattagact ttgttcaatg
720

ttatctggaa taggggtttg ataacttcaa aattcttcaa accactcagc acaagccatg
780

tggaattgat tcttcttttt caaaagaggt taasgaatca ttatgacttt ggaccccaac
840

atccactcat atgcanaagc atagagaaaa agtcagtggg atcacgctgc ctcaactgtg
900

gcnaaggcaa aaggccaaag aaagacggac agttagaaga ttctgcgaca acgttgtcat
960

catccagcta atgtagttag tggttgattc gtcagcaatg acgtaaaaaa ttgttatcga
1020

tcttactcc ctatctataa aaggttgagt tattttctct ggaaggacat ctcgaaactc
1080

ggagtctctt cttttcaaaa aatttatctt ttttaagttt tagtcttgt
1130

<210> 3

<211> 904

<212> ДНК

<213> Вірус, що викликає деформацію листа глухої кропиви

<220>

<221> промотор

<222> (1)..(504)

<223> Послідовність промотора LLDAV TK2

<400> 3

ctacaaggct gcaagagctc attaagatga acgattcttc atcgaccact tcttcaccac
60

cgagaagaaa aatcraagct ttbaaatth ctgtgaatgt ccagatcccg agatcgtaaa
120

agatgectat ctttgtggat tgatcaaaac aatctaccca ggtcttaac tcttggagat
180

ttctctcctt cctaaagaga taagaagaaa tgtcaagcta ttccagacgaa agtgcattaa
240

agatccaagt aagaaaaattt acttgaattt ctccagcact attcccagat ggggaaaaga
300

aggtgaacag gtttactgga cacatcacca tataactatg ggtgttcgtt ccgaagaaga
360

acaataccag ccttccagac aaatggaagc cacacttgag gttcaagacc ttgaagaact
420

agcigttaaa aaaattcaac agttcatcga aaagatggtt gaattcagca aggaagatta
480

gacttttgtc aatcttatat ggaatagggg ttgtataact tcaaaatctt tcaaaccaat
540

cagcacaaag catgtggaat tgattcttct tttcaaaaag aggttaaaga atcattatga
600

ctttggaccn caccatccac tcatatgcaa aagcatagag aaaaagtcag tggaaatacag
660

ctgctcaac tgtagcaaa gcaaaaggcc aaagaaagac ggacacgtag aagattctgc
720

gacaacgtcg tcatcatcna gctaatgtag ttagtgggtg attcgtcago aatgacgtaa
780

aacatttgta tcatctctca ctcccttatct ataaaaaggtt gagttatttt tcttgggaag
840

acatctcgaa actagcagtc ctctccttct aaaaaattta tcttttlaag tttttagtcg
900

tctg
964

<210> 4
<211> 885
<212> ДНК
<213> Вірус, що викликає деформацію листя пшухиї кривизни

<220>
<221> промотор
<222> (1)..(885)
<223> Послідовність промотора ILDAV TR3

<400> 4
cattaagatg aacgattctt catcgaccac ttcttcacca ccgagaagaa aaatctaagc
60

ttttacaatt tctgtgaatg ttcaagatctt gagatcgtaa aagatgccta tctttgtgga
120

ttgatcaaaa caatctacac aggtcctaaf ctcttggaga tttctctctt tcttaaagag
180

ataagaagaa atgtcaagct attcagacga aagtgcatta aagatccaag taagaaaatt
240

tacttgaat tctcagacac tattcccaaga tggggaaaag aaggtgaaca ggtttactgg
300

ccacatcacc atataactat ggggtgttctg tccgaagaag aacaatacca gccttccaga
360

aaaatggaag ccacacttga ggttcaagac ctgaagaac tagctgttca aaaaattcaa
420

cagttcatcg aaaagatgtt tgaattcaga aaggaagatt agacttttgt caatcttacc
480

tggaaatggg ttittgataac ttcaaaatct tcaaaaccac tcagcacaag ccattgtgga
540

ttgattcttc tttttcaaaa gaggttaag aatcattatg actttggacc ccaccatcca
600

ctcatatgca aaagcataga gaaaaagta gtggaataca gctgcctcaa ctgtagcaaa
660

ggcaaaaagg caaagaaga cggacacga gaagattctg cgacaacgtc gtcattcatc
720

agcfaatga gttagtgtt gattcgtcag caatgaagta aaacatttgt atcgatccct
780

acrccttarc tataaaaggt tgagttattt ttcttgggaag gacatctcga aactagcagt
840

cctctccttt caaaaaattt atctttttta gtttttagtc gtcgt
885

<210> 5

<211> 443

<212> ДНК

<213> Вірус, що викликає деформацію листя пухкої кривіни

<220>

<221> промотор

<222> (1)..(443)

<223> Послідовність промотора LBDAY TR4

<400> 5

aattcagcaa ggaagattag acttttgcac atcttatctg gaataggggt ttgataactt
60

caaaatcttt caaaccactc agcaccaagcc agtggaatt gattctcttt ttcaaaaaga
120

ggttaaagaa tcattangac ttgggacccc accatccact catatgcaaa agcatagaga
180

aaaagtcagt ggaatcagc tgcctcaact gtagcaagg caaaaggcca aagaangacg
240

gacacgtaga agattctgcg acaacgtcgt catcatccag ctactgtagt tagtggttga
300

tccgicagca atgacgtaaa acatttgtat cgatctccac tccctatcta taaaagggtg
360

agttactttt ctgggaagga catctcgaaa ctacagctcc tctcctttca aaaaatttat
420

ctttttaagt ttttagtcgt cgt
483

<210> 6

<211> 113

<212> ДНК

<213> Вірус, що викликає деформацію листя пухкої хреном

<400> 6

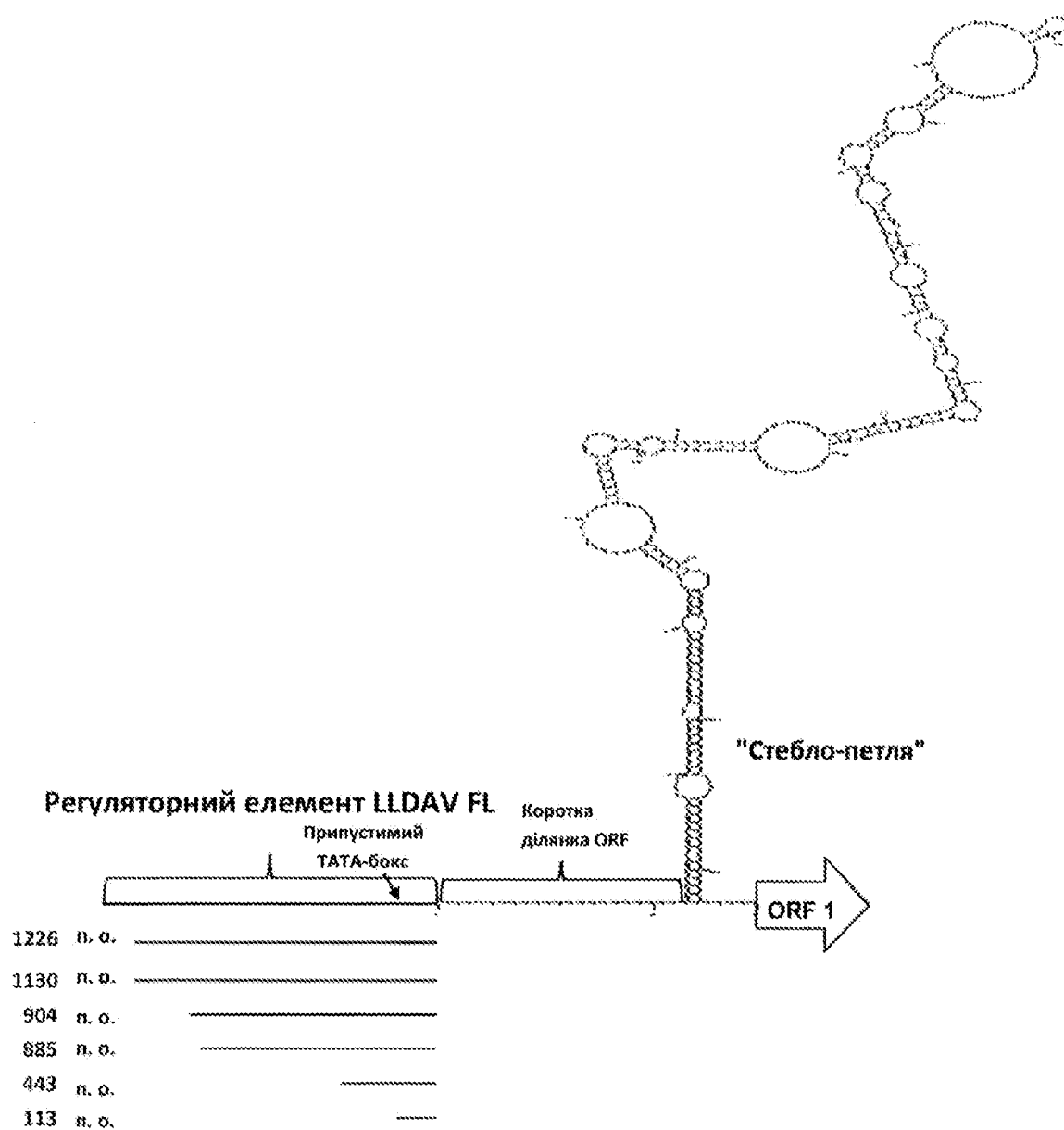
cgatctccac tccctatcta taaaagggtg agttactttt ctgggaagga catctcgaaa
60

ctacagctcc tctcctttca aaaaatttat ctttttaagt ttttagtcgt cgt
113

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. ДНК-конструкція, яка містить:
 - (а) промотор, вибраний із групи, що складається з
 - (i) полінуклеотиду, послідовність якого щонайменше на 85 відсотків ідентична послідовності нуклеїнової кислоти з SEQ ID NO: 1, де вказаний полінуклеотид має промоторну активність у клітині рослини,
 - 10 (ii) полінуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти з SEQ ID NO: 1,
 - (iii) полінуклеотиду з SEQ ID NO: 1, та
 - (iv) фрагмента з SEQ ID NO: 1, де вказаний фрагмент має промоторну активність у клітині рослини; та
 - (б) гетерологічну молекулу полінуклеотиду, що транскрибується, функціонально пов'язану з
 - 15 промотором.
2. ДНК-конструкція за п. 1, де промотор має щонайменше 90 відсотків ідентичності послідовності з послідовністю нуклеїнової кислоти з SEQ ID NO: 1.
3. ДНК-конструкція за п. 1, де промотор має щонайменше 95 відсотків ідентичності послідовності з послідовністю нуклеїнової кислоти з SEQ ID NO: 1.
- 20 4. ДНК-конструкція за п. 1, яка містить:
 - (а) промотор, вибраний із групи, що складається з
 - (i) полінуклеотиду, послідовність якого щонайменше на 85 відсотків ідентична послідовності нуклеїнової кислоти з SEQ ID NO: 2, де вказаний полінуклеотид має промоторну активність у клітині рослини,
 - 25 (ii) полінуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти з SEQ ID NO: 2,
 - (iii) полінуклеотиду з SEQ ID NO: 2, та
 - (iv) фрагмента з SEQ ID NO: 2, де вказаний фрагмент має промоторну активність у клітині рослини; та
 - (б) гетерологічну молекулу полінуклеотиду, що транскрибується, функціонально пов'язану з
 - 30 промотором.
5. ДНК-конструкція за п. 1, яка містить:
 - (а) промотор, вибраний із групи, що складається з
 - (i) полінуклеотиду, послідовність якого щонайменше на 85 відсотків ідентична послідовності нуклеїнової кислоти з SEQ ID NO: 3, де вказаний полінуклеотид має промоторну активність у
 - 35 клітині рослини,
 - (ii) полінуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти з SEQ ID NO: 3,
 - (iii) полінуклеотиду з SEQ ID NO: 3, та

- (iv) фрагмента з SEQ ID NO: 3, де вказаний фрагмент має промоторну активність у клітині рослини; та
- (b) гетерологічну молекулу полінуклеотиду, що транскрибується, функціонально пов'язану з промотором.
- 5 6. ДНК-конструкція за п. 1, яка містить:
- (a) промотор, вибраний із групи, що складається з
- (i) полінуклеотиду, послідовність якого щонайменше на 85 відсотків ідентична послідовності нуклеїнової кислоти з SEQ ID NO: 4, де вказаний полінуклеотид має промоторну активність у клітині рослини,
- 10 (ii) полінуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти з SEQ ID NO: 4,
- (iii) полінуклеотиду з SEQ ID NO: 4, та
- (iv) фрагмента з SEQ ID NO: 4, де вказаний фрагмент має промоторну активність у клітині рослини; та
- (b) гетерологічну молекулу полінуклеотиду, що транскрибується, функціонально пов'язану з промотором.
- 15 7. ДНК-конструкція за п. 1, яка містить:
- (a) промотор, вибраний із групи, що складається з
- (i) полінуклеотиду, послідовність якого щонайменше на 85 відсотків ідентична послідовності нуклеїнової кислоти з SEQ ID NO: 5, де вказаний полінуклеотид має промоторну активність у клітині рослини,
- 20 (ii) полінуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти з SEQ ID NO: 5,
- (iii) полінуклеотиду з SEQ ID NO: 5, та
- (iv) фрагмента з SEQ ID NO: 5, де вказаний фрагмент має промоторну активність у клітині рослини; та
- 25 (b) гетерологічну молекулу полінуклеотиду, що транскрибується, функціонально пов'язану з промотором.
8. ДНК-конструкція за будь-яким із пп. 1-7, де гетерологічна молекула полінуклеотиду, що транскрибується, являє собою ген, що становить агрономічний інтерес.
9. ДНК-конструкція за п. 8, де гетерологічна молекула полінуклеотиду, що транскрибується, являє собою ген, здатний забезпечувати у рослин стійкість до гербіцидів.
- 30 10. ДНК-конструкція за п. 8, де гетерологічна молекула полінуклеотиду, що транскрибується, являє собою ген, здатний забезпечувати у рослин контроль шкідників рослин.
11. Трансгенна рослина або клітина рослини, стабільно трансформована ДНК-конструкцією за будь-яким із пп. 1-10.
- 35 12. Трансгенна рослина або клітина рослини за п. 11, де трансгенна рослина або клітина рослини є дводольною рослиною або клітиною рослини.
13. Трансгенна рослина або клітина рослини за п. 11, де трансгенна рослина або клітина рослини є однодольною рослиною або клітиною рослини.
14. Насінина трансгенної рослини за п. 11, де насінина містить вказану ДНК-конструкцію.



Фіг. 1

cctacggtttttaaggattattatgttgtttttaatgggtccctctccaggtatctataccaattggcctgc

LLDAV TR1 1130 n. o.

agcacagcaagctacgaagaatgtttcgaatgttctacacaagaatacaaaaggcttcatagaagcaaga
acggcggcagattttatactgcataaatcatgggttagaacctctcaagttctattctgaagaagctactc
ttcaacccaagcagcctataaagaaaaagttccatccggcgaaactaccagctcttctctcaagaagctga

LLDAV TR2 904 n. o.

LLDAV TR3 885 n. o.

tacaccagatgtaaacattgtcatggaagacttcatgaatgtttacaaggctgcaagagcttattaagat
gaacgattcttcatcgaccacttcttccaccaccgagaagaaaaatctaagcttttacaatttctgtgaat
gttcagatcctgagatcgtaaaagatgcctatctttgtggattgatcaaaacaatctaccaggtcctaa
tctcttggagatttctctccttcttaaaagagataagaagaaatgtcaagctattcagaacgaaagtgcatt
aaagatccaagtaagaaaaatttacttgaaattctccagcactattcccagatgggggaaaaagaagggtgaac
agggttactggccacatcaccatataactatgggtgttcgttccgaagaagaacaataccagccttccag
acaaatggaagccacacttgagggttcaagaccttgaagaactagctgttcaaaaaattcaacagttcatc

LLDAV TR4 443 n. o.

gaaaagatgtttgaattcagcaaggaagattagacttttfgtcaatcttatctggaatagggttttgataa
cttcaaaatctttcaaaaccactcagcacaagccatgiggaaattgattcttctttttcaaaagaggttaaa
gaatcattatgactttggaccccaccatccactcatatgcaaaagcatagagaaaaagtcagtggaaatc
agctgcctcaactgtagcaaggcctaaaggccaaagaaagacgggacacgtagaagattctgcgacaacgt

LLDAV TR5 113 n. o.

cgltcatccagctaattgtagtttagtgggttgattcgtcagcaatgacgtaaaaacatttgtatggatcct
cactccttatctataaaaggttgagttattttcttgggaaggacatctcgaaactagcagtcctctcctt
tcaaaaaatttatctttttaagtttttagtgcgtcgt

Фір. 2