

Ця заявка заявляє пріоритет попередньої заявки [США № 61/785245, поданої 14 березня 2013 року], яка включена в цю заявку у повному обсязі шляхом посилання.

ВКЛЮЧЕННЯ СПИСКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

Список послідовностей, які містяться у файлі під назвою "MONS331WO.txt", розміром 54,4 Кб (виміряно в Microsoft Windows®), що був створений 12 березня 2014 року, подається при цьому в електронній формі і включений у цей документ шляхом посилання.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Цей винахід належить до галузі молекулярної біології рослин, генетичної інженерії рослин та молекул ДНК, придатних для модуляції експресії генів у рослинах.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Регуляторні елементи являють собою генетичні елементи, які регулюють активність генів шляхом модуляції транскрипції функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується. Такі елементи включають промотори, лідери, енхансери, інтрони та 3' нетрансльовані області та можуть бути використані в галузі молекулярної біології рослин та генетичної інженерії рослин.

СУТЬ ВИНАХОДУ

У цьому винаході запропоновані нові регуляторні елементи для використання в рослинах та генетичні конструкції, які містять регуляторні елементи. У цьому винаході також запропоновані трансгенні рослини, клітини рослин, частини рослин та насіння, які містять регуляторні елементи. В одному варіанті реалізації винаходу у винаході запропоновані регуляторні елементи, описані в цьому документі, функціонально пов'язані з молекулою ДНК, яка транскрибується. У деяких варіантах реалізації винаходу молекула ДНК, яка транскрибується, є гетерологічною відносно послідовності регуляторного елемента, запропонованого в цьому документі. У цьому документі також запропоновані способи одержання та застосування регуляторних елементів, описаних у цьому документі, включаючи генетичні конструкції, які містять регуляторні елементи та трансгенні рослини, клітини рослин, частини рослин і насіння, які містять регуляторні елементи, функціонально пов'язані з молекулою ДНК, яка транскрибується, гетерологічною відносно регуляторного елемента.

Таким чином, в одному аспекті у винаході запропонована рекомбінантна молекула ДНК, яка містить послідовність ДНК, обрану із групи, що складається з: а) послідовності ДНК із щонайменше близько 85 відсотками ідентичності послідовності до будь-якої з SEQ ID №: 1-20; б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID №: 1-20; і в) фрагмента будь-якої з SEQ ID №: 1-20, причому цей фрагмент має ген-регуляторну активність; при цьому послідовність ДНК функціонально пов'язана з гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується. Під «гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується» мають на увазі молекулу ДНК, яка транскрибується, яка є гетерологічною відносно послідовності ДНК. У конкретних варіантах реалізації винаходу рекомбінантна молекула ДНК містить послідовність ДНК, що має щонайменше близько 85 відсотків, щонайменше близько 86 відсотків, щонайменше близько 87 відсотків, щонайменше близько 88 відсотків, щонайменше близько 89 відсотків, щонайменше близько 90 відсотків, щонайменше близько 91 відсотка, щонайменше близько 92 відсотків, щонайменше близько 93 відсотків, щонайменше близько 94 відсотків, щонайменше близько 95 відсотків, щонайменше близько 96 відсотків, щонайменше близько 97 відсотків, щонайменше близько 98 відсотків або щонайменше 99 відсотків ідентичності послідовності до послідовності будь-якої ДНК з SEQ ID №: 1-20. У конкретних варіантах реалізації винаходу гетерологічна молекула ДНК, яка транскрибується, містить ген, який представляє агрономічний інтерес, наприклад, ген, здатний надавати рослинам стійкість до гербіцидів або шкідників. У ще інших варіантах реалізації винаходу у винаході запропонована генетична конструкція, яка містить рекомбінантну молекулу ДНК, як запропоновано в цьому документі.

В іншому аспекті в цьому документі пропонуються трансгенні клітини рослин, які містять рекомбінантну молекулу ДНК, яка включає послідовність ДНК, обрану із групи, що складається з: а) послідовності ДНК із щонайменше близько 85 відсотками ідентичності послідовності до будь-якої з SEQ ID №: 1-20; б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID №: 1-20; і в) фрагмента будь-якої з SEQ ID №: 1-20, причому цей фрагмент має ген-регуляторну активність; при цьому послідовність ДНК функціонально пов'язана з гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується. У деяких варіантах реалізації винаходу трансгенна клітина рослини являє собою клітину однодольної рослини. В інших варіантах реалізації винаходу трансгенна клітина рослини являє собою клітину дводольної рослини.

У ще іншому аспекті в цьому документі нижче наведено трансгенну рослину або її частину, яка містить рекомбінантну молекулу ДНК, яка містить послідовність ДНК, обрану із групи, що складається з: а) послідовності ДНК із щонайменше близько 85 відсотками ідентичності послідовності до будь-якої з SEQ ID № 1-20; б) послідовності ДНК, яка містить будь-яку з SEQ ID №: 1-20; і в) фрагмента будь-якої з SEQ ID №: 1-20, причому цей фрагмент має ген-регуляторну активність; при цьому послідовність ДНК функціонально пов'язана з гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується. У конкретних варіантах реалізації винаходу трансгенна рослина являє собою рослину-нащадок будь-якого покоління відносно вихідної трансгенної рослини та містить молекулу рекомбінантної ДНК.

Трансгенна насінина, яка містить рекомбінантну молекулу ДНК, яка породжує таку трансгенну рослину при вирощуванні, також пропонується у винаході.

В іншому аспекті у винаході запропонований спосіб отримання товарного продукту з трансгенної рослини, яка містить рекомбінантну молекулу ДНК відповідно до цього винаходу. Товарна продукція відповідно до цього винаходу містить кількість SEQ ID №: 1-20. Використовуваний в цьому документі термін "товарний продукт" належить до будь-якої композиції або продукту, який складається з матеріалу, отриманого з трансгенної рослини, частини рослини, рослинної клітини, або насіння, що містять рекомбінантну молекулу ДНК відповідно до цього винаходу. Товарна продукція, включає, але не обмежується цим, оброблене насіння, зерна, частини рослин та борошно грубого помелу. Трансгенні рослини, які містять рекомбінантну молекулу ДНК відповідно до цього винаходу, можуть бути використані для виготовлення будь-якого товарного продукту, як правило, отриманого з рослини. Товарний продукт відповідно до цього винаходу буде містити визначувану кількість ДНК, яке відповідає рекомбінантній молекулі ДНК відповідно до цього винаходу. Виявлення в зразку цієї однієї або більше рекомбінантних молекул ДНК може бути використане для визначення вмісту або джерела товарного продукту. Будь-який стандартний спосіб виявлення молекул ДНК може бути використаний, включаючи способи детекції, описані в цьому документі.

У ще одному аспекті у винаході запропоновано спосіб експресії молекули ДНК, яка транскрибується, наприклад, гена, який представляє агрономічний інтерес, у трансгенній рослині шляхом отримання трансгенної рослини, яка містить рекомбінантну молекулу ДНК відповідно до цього винаходу, і культивування рослини.

У цьому документі також запропоновано спосіб отримання трансгенної рослини шляхом трансформації рекомбінантною молекулою ДНК відповідно до цього винаходу для отримання трансформованої рослинної клітини та регенерації трансформованої клітини рослини для отримання трансгенної рослини.

Також цим винаходом запропоновано модифікований кодон кишкової палички (*E. coli*), що кодує послідовності β-глюкуронідази (*GUS*); причому модифікований кодон *GUS*-кодуючої послідовності демонструє більш високу експресію в трансгенній рослині, ніж нативна *GUS*-кодуюча послідовність *E. coli*. В одному варіанті реалізації винаходу модифікований кодон *GUS*-кодуючої послідовності може бути обраний з групи, що складається з SEQ ID №: 29 та 30. Трансгенна рослина може бути однодольною рослиною. В одному варіанті реалізації винаходу однодольна рослина може бути обрана з групи, яка включає кукурудзу (*Zea mays*), рис (*Oryza sativa*), пшеницю (*Triticum*), ячмінь (*Hordeum vulgare*), сорго (*Sorghum* spp.), просо, африканське просо (*Pennisetum glaucum*), пальчасте просо (*Eleusine coracana*), просо звичайне (*Panicum miliaceum*), мишій італійський (*Setaria italica*), овес (*Avena sativa*), тритикале, жито (*Secale cereale*), росичку (*Digitaria*), цибулі (*Allium* spp.), ананас (*Ananas* spp.), газонну траву, цукрову тростину (*Saccharum* spp.), пальми (*Arecaceae*), бамбук (*Bambuseae*), банани (*Musaceae*), імбирні (*Zingiberaceae*), лілії (*Lilium*), нарциси (*Narcissus*), півники (*Iris*), амарилліси, орхідеї (*Orchidaceae*), канни, дзвіночки (*Hyacinthoides*) та тюльпани (*Tulipa*). Трансгенні рослини також можуть бути дводольними рослинами. В одному варіанті реалізації винаходу дводольні рослини обрані з групи, яка включає сою (*Glycine max*), дику сою (*Glycine soja*), бавовник (*Gossypium*), томати (*Solanum lycopersicum*), перець (*Piper*), гарбуз (*Cucurbita*), горох (*Pisum sativum*), люцерну (*Medicago sativa*), *Medicago truncatula*, квасолю (*Phaseolus*), нут (*Cicer arietinum*), соняшник (*Helianthus annuus*), картоплю (*Solanum tuberosum*), арахіс (*Arachis hypogaea*), кінву, гречку посівну (*Fagopyrum esculentum*), ріжкове дерево (*Ceratonia siliqua*), буряк (*Beta vulgaris*), шпинат (*Spinacia oleracea*) та огірок (*Cucumis sativus*).

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фіг. 1a-1c ілюструють вирівнювання між нативною послідовністю (CR-Ec.uidA-1: 1: 4, SEQ ID №: 31), яка кодує β-глюкуронідазу (*GUS*) *E. coli*, та послідовністю модифікованих кодонів *GUS*-кодуючої послідовності *E. coli* (CR-Ec.uidA_nno-1: 1: 1, SEQ ID №: 30). Однакові нуклеотиди при вирівнюванні вказані зірочкою.

КОРОТКИЙ ОПИС ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 та 23 являють собою послідовності промотору.

SEQ ID №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 та 24 являють собою лідерні послідовності.

SEQ ID №: 25-28 являють собою праймери ампліфікації.

SEQ ID №: 29 та 30 являють собою модифіковані кодони *GUS*-кодуючої послідовності. SEQ ID №: 29 містить інтрон, що вирізається, а послідовність SEQ ID №: 30 являє собою непереривну кодуючу послідовність..

SEQ ID №: 31 являє собою нативну кодуючу послідовність β-глюкуронідази *Escherichia coli*.

SEQ ID №: 32 являє собою кодони *GUS*-кодуючу послідовність *GUS* з інтроном, що вирізається, на підставі SEQ ID №: 31 нативною β-глюкуронідази *E. coli*.

SEQ ID №: 33, 39 та 40 являє собою послідовність 3'- нетрансльованої області (3'-НТО).

SEQ ID №: 34-37, 41 та 44 являють собою послідовності груп регуляторних експресійних елементів (EXP), які містять промоторну послідовність, функціонально пов'язану 5' кінцем з лідерною

послідовністю, яка функціонально пов'язана 5' кінцем з послідовністю інтрону, або у випадку SEQ ID № 44, промоторну послідовність, функціонально пов'язану 5' кінцем з лідерною послідовністю.

SEQ ID №: 38 являє собою послідовність інтрону.

SEQ ID №: 42 та 44 являють собою послідовності, що кодують білки люциферази, які отримані з *Photinus pyralis* и *Renilla reniformis*, відповідно.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Цей винахід належить до молекул ДНК, які мають ген-регуляторну активність у рослинах. Нуклеотидні послідовності цих молекул ДНК наводяться в SEQ ID №: 1-20. Ці молекули ДНК, наприклад, здатні впливати на експресію функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується, у тканинах рослин і, отже, регулювати експресію функціонально пов'язаного трансгена в трансгенних рослинах. Цей винахід також належить до способів їх модифікації, створення і застосування. Цей винахід також належить до композицій, які включають трансгенні клітини рослин, рослини, частини рослин і насіння, що містять рекомбінантні молекули ДНК відповідно до цього винаходу, та до способів їхнього отримання і застосування.

Наступні визначення та способи пропонуються з метою кращого окреслення винаходу і спрямування до фахівців у цій галузі техніки при застосуванні винаходу. Якщо не вказано інше, терміни слід розуміти відповідно до загальноприйнятого використання фахівцями в цій галузі техніки.

Молекули ДНК

Використаний у цьому документі термін «ДНК» або «молекула ДНК» належить до дволанцюгової молекули ДНК клітинного або синтетичного походження, тобто до полімеру дезоксирибонуклеотидних основ. Використаний у цьому документі термін «ДНК послідовність» належить до нуклеотидної послідовності молекули ДНК. Номенклатура, використана в цьому документі, відповідає такій за документом [37 «Зведення федеральних нормативних актів Сполучених Штатів» § 1.822 і викладена у таблицях WIPO стандарту ST.25 (1998), додаток 2, таблиці 1 та 3].

Як використовується в цьому документі, «рекомбінантна молекула ДНК» являє собою молекулу ДНК, яка містить комбінацію молекул ДНК, які б не об'єдналися природним шляхом без втручання людини. Наприклад, рекомбінантна молекула ДНК може бути молекулою ДНК, яка складається щонайменше з двох гетерологічних по відношенню одна до одної молекул ДНК; молекулою ДНК, що містить послідовність ДНК, яка відхиляється від існуючих у природі послідовностей ДНК; або молекулою ДНК, яка була вбудована у ДНК клітини-хазяїна шляхом генетичної трансформації.

Як використовується в цьому документі, термін «ідентичність послідовностей» належить до ступеня, в якому дві оптимально вирівняні послідовності ДНК є ідентичними. Оптимальне вирівнювання послідовностей створюється шляхом вирівнювання двох послідовностей ДНК вручну, наприклад, референсної послідовності та іншої послідовності ДНК, для створення максимальної кількості відповідностей між нуклеотидами при вирівнюванні послідовностей із відповідними внутрішніми нуклеотидними вставками, делеціями або розривами. Використаний у цьому документі термін «референсна послідовність» належить до послідовності ДНК, яка наводиться в SEQ ID №: 1-20.

Використаний в цьому документі термін «відсоток ідентичності послідовностей» або «відсоток ідентичності», або «% ідентичності» являє собою частку ідентичності помножену на 100. «Частка ідентичності» для послідовності ДНК, оптимально вирівняної із початковою послідовністю, являє собою число відповідностей між нуклеотидами при оптимальному вирівнюванні поділене на загальне число нуклеотидів у референсній послідовності, наприклад, на загальне число нуклеотидів всієї повнорозмірної референсної послідовності. Таким чином, в одному варіанті реалізації винахід належить до молекули ДНК, яка містить послідовність ДНК, котра при оптимальному вирівнюванні з референсною послідовністю, представленою в цьому документі як SEQ ID №: 1-20, має щонайменше близько 85 відсотків ідентичності, щонайменше близько 86 відсотків ідентичності, щонайменше близько 87 відсотків ідентичності, щонайменше близько 88 відсотків ідентичності, щонайменше близько 89 відсотків ідентичності, щонайменше близько 90 відсотків ідентичності, щонайменше близько 91 відсотка ідентичності, щонайменше близько 92 відсотків ідентичності, щонайменше близько 93 відсотків ідентичності, щонайменше близько 94 відсотків ідентичності, щонайменше близько 95 відсотків ідентичності, щонайменше близько 96 відсотків ідентичності, щонайменше близько 97 відсотків ідентичності, щонайменше близько 98 відсотків ідентичності, щонайменше близько 99 відсотків ідентичності або щонайменше близько 100 відсотків ідентичності з референсною послідовністю.

Регуляторні елементи

Регуляторні елементи такі як промотори, лідери, енхансери, інтрони та області термінації транскрипції (або 3' НТО) відіграють суттєву роль у загальній експресії генів у живих клітинах. Термін «регуляторний елемент», який використовується в цьому документі, належить до молекул ДНК, які мають ген-регуляторну активність. Термін «ген-регуляторна активність», який використовується в цьому документі, належить до здатності впливати на експресію функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується, наприклад, шляхом впливу на транскрипцію та/або трансляцію

функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується. Регуляторні елементи, такі як промотори, лідери, ехансери та інтрони, 3' НТО, які функціонують у рослинах, є, таким чином, корисними для модифікації фенотипів рослин за допомогою генетичної інженерії.

Використана в цьому документі «група регуляторних елементів експресії» або «EXP» послідовність може відноситися до групи функціонально пов'язаних регуляторних елементів, таких як ехансери, промотори, лідери та інтрони. Таким чином, група регуляторних елементів експресії може складатися, наприклад, із промотору, функціонально пов'язаного 5' кінцем з лидерною послідовністю, яка, у свою чергу, функціонально пов'язана 5' кінцем з послідовністю інтрону.

Регуляторні елементи можуть бути охарактеризовані за своїм характером експресії генів, наприклад, за позитивним і/або негативним впливами, такими як конститутивна експресія або тимчасова, просторова, залежна від стадії розвитку, тканинна, залежна від оточення, фізіологічна, патологічна, клітинного циклу і/або хімічно чутлива експресія, і будь-яка з їхніх комбінацій, а також за кількісними або якісними показниками. Використаний в цьому документі термін «характер експресії гена» являє собою будь-яку особливість транскрипції функціонально пов'язаної молекули ДНК в молекулу РНК, яка транскрибується. Молекула РНК, яка транскрибується, може бути трансльована для отримання молекули білка або може утворити антисмислову або іншу регуляторну молекулу РНК, таку як дволанцюгова РНК (дцРНК), транспортна РНК (тРНК), рибосомальна РНК (рРНК), мікроРНК (мікроРНК) тощо.

Використаний в цьому документі термін «експресія білка» являє собою будь-яку особливість трансляції молекули РНК, яка транскрибується, в молекулу білка. Експресія білка може бути охарактеризована за своїми часовими, просторовими, належними до стадії розвитку або морфологічними якостями, а також за кількісними або якісними показниками.

Промотор є корисним в якості регуляторного елемента для модуляції експресії функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується. Як використовується в цьому документі термін «промотор» належить в загальному розумінні до молекули ДНК, яка бере участь у розпізнаванні та зв'язуванні РНК-полімерази II та інших білків, таких як транс-діючі фактори транскрипції, для ініціації транскрипції. Промотор може походити з 5' нетрансльованої області (5' НТО) гена. В альтернативному варіанті промотори можуть бути отримані синтетичним шляхом або в результаті маніпулювання молекулою ДНК. Промотори також можуть бути химерними. Химерні промотори отримують шляхом злиття двох або більше гетерологічних молекул ДНК. Промотори, корисні у практичній реалізації винаходу, включають SEQ ID № 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19, включаючи їхні фрагменти або варіанти. У конкретних варіантах реалізації винаходу такі молекули ДНК та будь-які їхні варіанти або похідні, описані в цьому документі, далі визначаються як такі, що мають промоторну активність, тобто здатні діяти як промотор у клітині хазяїна, такого як трансгенна рослина. У ще додаткових конкретних варіантах реалізації винаходу фрагмент може бути визначений як такий, що виявляє промоторну активність, яку має вихідна молекула промотору, з якої він був отриманий, або фрагмент може містити «мінімальний промотор», який забезпечує основний рівень транскрипції та включає ТАТА-бокс або еквівалентну послідовність ДНК для розпізнавання і зв'язування комплексу РНК-полімерази II з метою ініціації транскрипції.

В одному варіанті реалізації винаходу фрагменти забезпечені промоторною послідовністю, описаною в цьому документі. Фрагменти промоторів можуть включати промоторну активність, як описано вище, та можуть бути корисними окремо або в комбінації з іншими промоторами і фрагментами промоторів, наприклад, при створенні химерних промоторів. У конкретних варіантах реалізації винаходу пропонуються фрагменти промотору, що містять щонайменше близько 50, щонайменше близько 75, щонайменше близько 95, щонайменше близько 100, щонайменше близько 125, щонайменше близько 150, щонайменше близько 175, щонайменше близько 200, щонайменше близько 225, щонайменше близько 250, щонайменше близько 275, щонайменше близько 300, щонайменше близько 500, щонайменше близько 600, щонайменше близько 700, щонайменше близько 750, щонайменше близько 800, щонайменше близько 900, або щонайменше близько 1000 послідовних нуклеотидів або більше, молекули ДНК, яка має промоторну активність, описану в цьому документі. Способи отримання таких фрагментів із вихідної молекули промотору добре відомі у цій галузі техніки.

Композиції, отримані з будь-яких промоторів, представлених у SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19, такі як внутрішні або 5' делеції, наприклад, можуть бути отримані з використанням добре відомих у цій галузі техніки способів поліпшення або зміни експресії, включаючи видалення елементів, які мають позитивні чи негативні впливи на експресію; подвоєння елементів, які мають позитивні чи негативні впливи на експресію; та/або подвоєння або видалення елементів, які мають тканино- або клітино-специфічні впливи на експресію. Композиції, отримані з будь-яких промоторів, представлених у SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19, які містять 3' делеції, в яких елемент ТАТА-боксу або його еквівалентна послідовність ДНК та послідовність, яка знаходиться нижче, видалені, можуть бути використані, наприклад, для створення ехансерних елементів. Додаткові делеції можуть бути внесені для видалення будь-яких елементів, які мають позитивні чи негативні,

тканино-специфічні, клітино-специфічні або часо-специфічні (такі як, проте не обмежуючись цими, добові ритми) впливи на експресію. Будь-який із промоторів, представлений у SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19, і фрагменти або енхансери, отримані з них, можуть бути використані для отримання композицій химерних регуляторних елементів, які містять будь-який із промоторів, представлених у SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19, і фрагменти або енхансери, отримані з них, функціонально пов'язані з іншими енхансерами та промоторами.

Відповідно до цього винаходу, промотор або фрагмент промотору можуть бути проаналізовані на наявність відомих промоторних елементів, тобто характеристик послідовності ДНК, таких як ТАТА-бокс та інших відомих мотивів сайтів зв'язування транскрипційних факторів. Ідентифікація таких відомих промоторних елементів може бути використана фахівцем у цій галузі техніки для розробки варіантів промотору, які мають схожий характер експресії, як і вихідний промотор.

Використаний у цьому документі термін «лідер» належить до молекули ДНК із 5' нетрансльованої області (5' НТО) гена і визначається в загальному розумінні як сегмент ДНК між сайтом ініціації транскрипції (СІТ) і початковим сайтом послідовності, яка кодує білок. В альтернативному варіанті лідери можуть бути отримані синтетичним шляхом або в результаті маніпулювання елементами ДНК. Лідер може бути використаний як 5' регуляторний елемент для модуляції експресії функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується. Молекули лідерів можуть бути використані з гетерологічним промотором або з їхнім нативним промотором. Молекули промоторів відповідно до цього винаходу, таким чином, можуть бути функціонально пов'язаними з їхнім нативним лідером або можуть бути функціонально пов'язаними з гетерологічним лідером. Лідери, корисні у практичній реалізації винаходу, включають SEQ ID №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 та 20, або їхні фрагменти, або варіанти. У конкретних варіантах реалізації винаходу такі послідовності ДНК можуть бути визначені як здатні діяти як лідер в клітині-хазяїні, включаючи, наприклад, трансгенну клітину рослини. В одному варіанті реалізації винаходу такі послідовності ДНК можуть бути розшифровані як такі, що включають лідерну активність.

Лідерні послідовності (5' НТО), представлені в SEQ ID №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 і 20, можуть складатися з регуляторних елементів або можуть приймати вторинні структури, які впливають на транскрипцію або трансляцію функціонально пов'язаної молекули ДНК. Лідерні послідовності, представлені в SEQ ID №: №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 і 20, можуть бути використані, відповідно до винаходу, для створення химерних регуляторних елементів, які впливають на транскрипцію або трансляцію функціонально пов'язаної молекули ДНК. На додаток, лідерні послідовності, представлені в SEQ ID №: №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 і 20, можуть бути використані для створення химерних лідерних послідовностей, які впливають на транскрипцію або трансляцію функціонально пов'язаної молекули ДНК.

Використаний у цьому документі термін «інтрон» належить до молекули ДНК, яка може бути виділена або ідентифікована з геномної копії гена і може бути визначена в загальному розумінні як область, яка вирізається під час процесингу інформаційної РНК (мРНК) до трансляції. В альтернативному варіанті інтрон може бути отриманий синтетичним шляхом або в результаті маніпулювання елементом ДНК. Інтрон може містити енхансерні елементи, які впливають на транскрипцію функціонально пов'язаних генів. Інтрон може бути використаний як регуляторний елемент для модуляції експресії функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується. Генетична конструкція може містити інтрон, та інтрон може бути чи не бути гетерологічним відносно молекули ДНК, яка транскрибується. Приклади інтронів у цій галузі техніки включають інтрон актину рису та інтрон HSP70 кукурудзи.

У порівнянні з генетичними конструкціями без інтрону, включення деяких інтронів у генетичні конструкції призводить до збільшення накопичення мРНК і білка в рослинах. Цей ефект був названий як «інтрон-опосередковане підсилення» (ІМЕ) експресії генів (Mascarenhas *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 15:913-920, 1990). Інтрони, які стимулюють експресію в рослинах, були ідентифіковані в генах кукурудзи (наприклад, *tubA1*, *Adh1*, *Sh1* та *Ubi1*), в генах рису (наприклад, *tpi*) та в генах дводольних рослин, таких як петунія (наприклад, *rbcS*), картопля (наприклад, *st-ls1*) і *Arabidopsis thaliana* (наприклад, *ubq3* і *pat1*). Було показано, що делеції або мутації у межах сайтів сплайсингу інтрону знижують експресію генів, вказуючи на те, що сплайсинг може бути необхідний для ІМЕ. Однак сплайсинг сам по собі не потребується, оскільки ІМЕ було показано для дводольних рослин, за допомогою точкових мутацій в межах сайтів сплайсингу *pat1* гена з *A. thaliana*. Було показано, що багаторазове використання одного і того самого інтрону в одній рослині виявляє недоліки. У таких випадках необхідно мати колекцію основних елементів контролю для створення відповідних рекомбінантних елементів ДНК.

Використаний у цьому документі термін «3' молекула термінації транскрипції», «3' нетрансльована область» або «3' НТО» належить до молекули ДНК, яка використовується під час транскрипції із нетрансльованої області 3' частини молекули мРНК. 3' нетрансльована область молекули мРНК може бути отримана шляхом специфічного розщеплення і 3' поліаденилюванням, також відомим як полі(А)-хвіст. 3' НТО може бути функціонально пов'язана з молекулою ДНК, яка транскрибується, і

розташовуватися нижче від неї, і може включати сигнал поліаденилювання та інші регуляторні сигнали, здатні впливати на транскрипцію, процесинг мРНК або експресію генів. Вважають, що полі(А)-хвости виконують функції стабілізації мРНК та ініціації трансляції. Приклади 3' молекул термінації транскрипції у цій галузі техніки являють собою 3' область нопалінсинтази, 3' область hsp17 пшениці, 3' область малої субодиниці RuBisCO гороху, 3' область Е6 бавовни і 3' НТО бусенника.

3' НТО, як правило, знаходять корисне застосування для рекомбінантної експресії специфічних молекул ДНК. Слабка 3' НТО може генерувати наскрізне зчитування, що може вплинути на експресію молекули ДНК, розташованої у сусідніх експресійних касетах. Відповідний контроль для термінації транскрипції може запобігти наскрізному зчитуванню в послідовностях ДНК (наприклад, інших експресійних касет), локалізованих нижче, і може додатково забезпечити ефективне повторне використання РНК-полімерази, для поліпшення експресії генів. Ефективна термінація транскрипції (звільнення РНК-полімерази II із ДНК) є передумовою для наступної ініціації транскрипції і, таким чином, безпосередньо впливає на загальний рівень транскрипту. Після термінації транскрипції зріла мРНК звільняється з місця синтезу, і матриця транспортується в цитоплазму. Еукаріотичні мРНК накопичуються в формах полі(А) *in vivo*, що ускладнює виявлення сайтів термінації транскрипції загальноприйнятими способами. Однак передбачення функціональних та ефективних 3' НТО за допомогою біоінформатичних способів ускладнене, оскільки відсутні консервативні послідовності ДНК, які дозволяють легко передбачати ефективну 3' НТО.

Із практичної точки зору, як правило, корисно, щоб 3' НТО, використана в експресійній касеті, мала наступні характеристики. 3' НТО повинна бути здатною раціонально та ефективно завершувати транскрипцію ДНК та запобігати наскрізному зчитуванню транскрипту в будь-якій із сусідніх послідовностей ДНК, яка може міститися в іншій експресійній касеті, як і у випадку декількох експресійних касет, які належать одній трансферній ДНК (Т-ДНК), або сусідній хромосомній ДНК, в яку Т-ДНК була вбудована. 3' НТО не повинна призводити до зниження транскрипційної активності наданої промотором, лідером, енхансерами та інтронами, які використовуються для контролювання експресії молекули ДНК. У біотехнології рослин 3' НТО часто використовується для затравки реакцій ампліфікації РНК, яка зворотно транскрибується, виділеної із трансформованих рослин, та використовується для: 1) оцінки транскрипційної активності або експресії експресійної касети, інтегрованої у хромосому рослини; 2) оцінки кількості копій вставок у ДНК рослини; та 3) оцінки зиготності отриманої насінини після розмноження. 3' НТО також використовується в реакціях ампліфікації ДНК, екстрагованої із трансформованих рослин, для визначення інтактності вбудованої касети.

Використаний у цьому документі термін «енхансер» або «енхансерний елемент» належить до цис-діючого регуляторного елемента, названого цис-елементом, який надає аспект загального характеру експресії, але, як правило, недостатній сам по собі для контролювання транскрипції функціонально пов'язаної послідовності ДНК. На відміну від промоторів, енхансерні елементи зазвичай не включають сайт ініціації транскрипції (CIT) або ТАТА-бокс, або еквіваленту послідовностей ДНК. Промотор або фрагмент промотору за природою може містити один або більше енхансерних елементів, які впливають на транскрипцію функціонально пов'язаної послідовності ДНК. Енхансерний елемент також може бути об'єднаний із промотором для отримання химерного промоторного цис-елемента, що додає аспект загальної модуляції експресії генів.

Вважають, що численні енхансерні елементи промотору зв'язують ДНК-зв'язуючі білки та/або впливають на топологію ДНК, створюючи локальні конформації, які вибірково дозволяють або обмежують доступ РНК-полімерази до ДНК-матриці або які полегшують вибіркове відкривання подвійної спіралі на ділянці ініціації транскрипції. Енхансерний елемент також може виконувати функцію зв'язування транскрипційних факторів, які регулюють транскрипцію. Деякі енхансерні елементи зв'язують більш ніж один фактор транскрипції, і транскрипційні фактори можуть взаємодіяти із різною афінністю із більш ніж одним доменом енхансеру. Енхансерні елементи можуть бути ідентифіковані за допомогою ряду методів, включаючи аналіз делецій, тобто видалення одного або більше нуклеотидів із 5' кінця або всередині промотору; аналіз ДНК-зв'язуючого білка, з використанням футпринтингу ДНКазі I, інтерференцію метилювання, аналізи зсуву електрофоретичної мобільності, *in vivo* геномний футпринтинг шляхом лігування-опосередкованої полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та інших загальноприйнятих аналізів; або шляхом аналізу подібності послідовностей ДНК, використовуючи відомі мотиви цис-елементів або енхансерних елементів, як цільову послідовність або цільовий мотив, із загальноприйнятими способами порівняння послідовностей ДНК, таких як BLAST. Тонка структура домена енхансеру може бути додатково досліджена шляхом мутагенезу (або заміщення) одного або більше нуклеотидів або іншими загальноприйнятими способами, відомими у цій галузі техніки. Енхансерні елементи можуть бути отримані шляхом хімічного синтезу або шляхом виділення із регуляторних елементів, які включають такі елементи, і вони можуть бути синтезовані з додатковими фланкуючими нуклеотидами, які включають корисні сайти рестрикції для полегшення подальших маніпуляцій. Таким

чином, розробка, створення і використання енхансерних елементів, у відповідності до способів, описаних у цьому документі, для модуляції експресії функціонально пов'язаних молекул ДНК, які транскрибуються, охоплюються за цим винаходом.

Використаний у цьому документі термін «химерний» належить до окремої молекули ДНК, отриманої шляхом злиття першої молекули ДНК із другою молекулою ДНК, де ані перша, ані друга молекула ДНК зазвичай не будуть міститися у такій конфігурації, тобто не будуть об'єднані одна із одною. Химерна молекула ДНК, таким чином, являє собою нову молекулу ДНК, інакше кажучи, таку, яка не міститься зазвичай у природі. Використаний у цьому документі термін «химерний промотор» належить до промотору, який отримано за допомогою такого маніпулювання молекулами ДНК. Химерний промотор може об'єднувати два або більше фрагментів ДНК, наприклад, злиття промотору із енхансерним елементом. Таким чином, розробка, створення і використання химерних промоторів, у відповідності до способів, описаних у цьому документі, для модуляції експресії функціонально пов'язаних молекул ДНК, які транскрибуються, охоплюються відповідно до цього винаходу.

Використаний у цьому документі термін «варіант» належить до другої молекули ДНК, такої як регуляторний елемент, яка аналогічна за композицією, але не ідентична першій молекулі ДНК, і причому друга молекула ДНК все ще зберігає загальну функціональність, тобто такий самий або аналогічний характер експресії, наприклад, через більшу або меншу, або еквівалентну транскрипційну або трансляційну активність у порівнянні із першою молекулою ДНК. Варіант може бути укороченою або усіченою версією першої молекули ДНК та/або зміненою версією послідовності ДНК першої молекули ДНК, такої як варіант із різними сайтами рестрикції та/або внутрішніми делеціями, замінами та/або вставками. «Варіанти» регуляторного елемента також охоплюють варіанти, які виникають у результаті мутацій, котрі відбуваються під час або в результаті трансформації клітин бактерій та рослин. У цьому винаході послідовність ДНК, наведена в SEQ ID №: 1-20, може бути використана для створення варіантів, які аналогічні за композицією, але не ідентичні послідовності ДНК вихідного регуляторного елемента, хоча все ще зберігають загальну функціональність, тобто такий самий або аналогічний характер експресії, як і вихідний регуляторний елемент. Отримання таких варіантів відповідно до цього винаходу знаходиться в межах звичайної кваліфікації у цій галузі техніки у висвітленому описі та здійснено в межах обсягу цього винаходу.

Химерні регуляторні елементи можуть бути розроблені для включення різних складових елементів, які можуть бути функціонально пов'язані різними способами, відомими в цій галузі техніки, такими як розщеплення ферментами рестрикції та лігування, клонування незалежне від лігування, модульне збирання продуктів ПЛР у процесі ампліфікації або прямий хімічний синтез регуляторного елемента, а також іншими способами, відомими в цій галузі техніки. Отримані різні химерні регуляторні елементи можуть складатися із тих самих або варіантів тих самих складових елементів, але відрізнятися за послідовністю ДНК, або послідовностей ДНК, які включають зв'язуючу послідовність ДНК, або послідовностей, які дозволяють складовим частинам бути функціонально пов'язаними. У винаході послідовність ДНК, що наводиться в SEQ ID №: 1-20, може забезпечити референсну послідовність регуляторного елемента, в якій складові елементи, які включають референсну послідовність, можуть бути з'єднані способами, відомими в цій галузі техніки, та можуть включати заміни, делеції та/або вставки одного або більше нуклеотидів або мутацій, які зазвичай зустрічаються при трансформації клітин бактерій та рослин.

Дієвість модифікацій, дублікацій або делецій, описаних у цьому документі, на бажані аспекти експресії конкретного трансгена може бути перевірена емпірично у стабільних і транзійних тестах рослин, таких як ті, що описані в робочих прикладах у цьому документі, для підтвердження результатів, які можуть варіювати залежно від проведених змін і мети зміни вихідної молекули ДНК.

Генетичні конструкції

Використаний у цьому документі термін «генетична конструкція» означає будь-яку рекомбінантну молекулу ДНК, таку як плазміда, косміда, вірус, фаг або лінійну або кільцеву молекулу ДНК або РНК, отриману із будь-якого джерела, здатну до геномної інтеграції або автономної реплікації, яка включає молекулу ДНК, де щонайменше одна молекула ДНК пов'язана з іншою молекулою ДНК функціонально діючим способом, тобто функціонально пов'язані між собою. Використаний у цьому документі термін «вектор» означає будь-яку генетичну конструкцію, яка може бути використана з метою трансформації, тобто введення гетерологічної ДНК або РНК у клітину хазяїна. Генетична конструкція, як правило, включає одну або більше експресійних касет. Як використано в цьому документі «експресійна касета» належить до молекули ДНК, що містить щонайменше молекулу ДНК, яка транскрибується, функціонально пов'язану із одним або більше регуляторних елементів, як правило, щонайменше із промотором і 3' НТО.

Використаний у цьому документі термін «функціонально пов'язаний» належить до першої молекули ДНК, з'єднаної з другою молекулою ДНК, причому перша і друга молекули ДНК розташовані так, що перша молекула ДНК впливає на функцію другої молекули ДНК. Дві молекули ДНК можуть бути або не бути частиною єдиної неперервної молекули ДНК і можуть бути чи не бути суміжними. Наприклад, промотор є функціонально пов'язаним із молекулою ДНК, яка транскрибується, якщо

промотор модулює транскрипцію цільової молекули ДНК, яка транскрибується у клітині. Лідер, наприклад, є функціонально пов'язаним із послідовністю ДНК, коли він здатний впливати на транскрипцію або трансляцію послідовності ДНК.

Генетичні конструкції відповідно до цього винаходу можуть бути запропоновані в одному варіанті реалізації винаходу як генетичні конструкції, які складаються із двох граничних областей пухлиноіндукуючої плазмиди (Ti), що мають області правої граничної ділянки (RB або AGRtu.RB) і лівої граничної ділянки (LB або AGRtu.LB) Ti -плазмиди, ізольованої з *Agrobacterium tumefaciens*, яка містить Т-ДНК, яка разом із перенесенням молекул, що забезпечується клітинами *A. tumefaciens*, дозволяє інтеграцію Т-ДНК у геном клітини рослини (див., наприклад, патент США 6603061). Генетичні конструкції також можуть містити сегменти плазмідного каркасу ДНК, які забезпечують функцію реплікації та селекції на антибіотику в клітинах бактерій, наприклад, реплікації *Escherichia coli*, такий як ori322, реплікації для широкого спектру хазяїв, такий як oriV або oriRi, і кодуючу область селективного маркера, такого як Spec/Strp, який кодує Tn7 аміноглікозид аденілтрансферазу (*aadA*), що надає стійкість до спектиноміцину або стрептоміцину, або селективний маркерний ген гентаміцину (Gm, Gent). Для трансформації рослин часто використовують бактеріальний штам хазяїна ABI, C58 або LBA4404 *A. tumefaciens*, проте інші штами, відомі фахівцям у галузі трансформації рослин, можуть функціонувати у цьому винаході.

У цій галузі техніки відомі способи для збірки та введення генетичних конструкцій у клітину у такий спосіб, що молекула ДНК, яка транскрибується, транскрибується у функціональну молекулу мРНК, яка транслюється та експресується у вигляді білка. Для здійснення винаходу на практиці загальноприйняті композиції та способи отримання і використання генетичних конструкцій та клітин хазяїна добре відомі фахівцям у цій галузі техніки. Типові вектори, використані для експресії нуклеїнових кислот у вищих рослинах, добре відомі у цій галузі техніки та включають вектори, отримані з Ti-плазмиди *Agrobacterium tumefaciens* та pCaMVCN контрольного вектора для перенесення.

Різні регуляторні елементи можуть бути включені в генетичну конструкцію, включаючи будь-який з тих, що запропонований у цьому документі. Будь-які такі регуляторні елементи можуть бути запропоновані в поєднанні з іншими регуляторними елементами. Такі комбінації можуть бути розроблені або модифіковані для отримання бажаних регуляторних функцій. В одному варіанті реалізації винаходу генетичні конструкції відповідно до цього винаходу містять щонайменше один регуляторний елемент, функціонально пов'язаний із молекулою ДНК, яка транскрибується, яка функціонально пов'язана з 3' НТО.

Генетичні конструкції відповідно до цього винаходу можуть включати будь-який промотор або лідер, запропоновані в цьому документі або відомі у цій галузі техніки. Наприклад, промотор за винаходом може бути функціонально пов'язаний із гетерологічним нетрансльованим 5' лідером, таким як один з отриманих із гена білка теплового шоку. В альтернативному варіанті лідер за винаходом може бути функціонально пов'язаним із гетерологічним промотором, таким як 35S промоторний транскрипт вірусу мозаїки цвітної капусти (Cauliflower Mosaic Virus).

Експресійні касети також можуть включати кодуючу послідовність транзитного пептиду, яка кодує пептид, корисний для внутрішньоклітинного спрямування функціонально пов'язаного білка, зокрема, до хлоропласту, лейкопласту або іншої пластидної органели, мітохондрії, пероксисоми, вакуолі або позаклітинного простору. Багато білків, локалізованих у хлоропластах, експресуються генами ядра як попередники і спрямовуються до хлоропласту за допомогою транзитного пептиду хлоропласту (ТПХ). Приклади таких білків, ізольованих із хлоропластів, включають, але не обмежуються цими, білки, асоційовані з малою субодиницею (МСО) рибулозо-1,5,-біфосфат карбоксилази, ферредоксин, ферредоксин оксидоредуктазу, білок I і білок II фотосенсибілізуєчого комплексу, тіоредоксин F і енолпірувіл шикимат фосфатсинтазу (ЕПШФС). Транзитні пептиди хлоропластів описані, наприклад, в [патенті США № 7193133]. Було показано, що нехлоропластні білки можуть бути спрямовані до хлоропласту при експресії гетерологічного ТПХ, функціонально пов'язаного з трансгеном, який кодує нехлоропластні білки.

Молекула ДНК, яка транскрибується

Використаний у цьому документі термін «молекула ДНК, яка транскрибується» належить до будь-якої молекули ДНК, здатної транскрибуватися в молекулу РНК, включаючи, але не обмежуючись цим, ті, що мають послідовності, які кодують білок, і ті, що утворюють молекули РНК, які мають послідовності, корисні для супресії гена. Тип молекули ДНК може включати, але не обмежується цими, молекулу ДНК із тієї самої рослини, молекулу ДНК з іншої рослини, молекулу ДНК з іншого організму або синтетичну молекулу ДНК, таку як молекула ДНК, що містить антисмислову послідовність гена, або молекулу ДНК, що кодує штучну, синтетичну або іншим чином модифіковану версію трансгена. Типова молекула ДНК, яка транскрибується, для включення в генетичні конструкції за винаходом включає, наприклад, молекули ДНК або гени з іншого виду, ніж той, в який молекула ДНК вбудована, або гени, які походять з або присутні в тому самому виді, але які включені в клітини-реципієнти способами генетичної інженерії, а не класичними методами розмноження.

«Трансген» належить до молекули ДНК, яка транскрибується, гетерологічною для клітини-хазяїна щонайменше щодо її розташування в геномі клітини-хазяїна та/або молекули ДНК, яка транскрибується, яка штучно включена в геном клітини-хазяїна у цьому або у будь-якому із попередніх поколінь клітин.

Регуляторний елемент, такий як промотор відповідно до цього винаходу, може бути функціонально пов'язаним із молекулою ДНК, яка транскрибується, яка гетерологічна відносно регуляторного елемента. Використаний у цьому документі термін «гетерологічний» належить до комбінації із двох або більше молекул ДНК, якщо така комбінація зазвичай не зустрічається у природі. Наприклад, дві молекули ДНК можуть бути отримані з різних видів і/або дві молекули ДНК можуть бути отримані з різних генів, наприклад, різних генів одного і того самого виду, або ж одних і тих самих генів із різних видів. Регуляторний елемент є, таким чином, гетерологічним відносно функціонально пов'язаної молекули ДНК, яка транскрибується, якщо така комбінація зазвичай не зустрічається у природі, тобто молекула ДНК, яка транскрибується, зазвичай не буває функціонально пов'язаною із регуляторним елементом.

Молекула ДНК, яка транскрибується, у загальному розумінні може бути будь-якою молекулою ДНК, для якої бажана експресія транскрипту. Така експресія транскрипту може призводити до трансляції отриманої молекули мРНК і, відповідно, до експресії білка. В альтернативному варіанті, наприклад, молекула ДНК, яка транскрибується, може бути розроблена так, щоб у підсумку викликати зменшення експресії конкретного гена або білка. В одному варіанті реалізації цього винаходу це може бути досягнуто за допомогою молекули ДНК, яка транскрибується, орієнтованої в антисмисловому напрямку. Фахівець у цій галузі техніки добре обізнаний із використанням такої антисмислової технології. Будь-який ген може негативно регулюватися у такий спосіб, і в одному варіанті реалізації винаходу молекула ДНК, яка транскрибується, може бути розроблена для супресії конкретного гена шляхом експресії дцРНК, міРНК або мікроРНК молекули.

Таким чином, в одному варіанті реалізації цього винаходу представляється рекомбінантна молекула ДНК, яка містить регуляторний елемент за винаходом, такий як ті, що запропоновані в SEQ ID №: 1-20, функціонально пов'язаний з гетерологічною молекулою ДНК, яка транскрибується, для модулювання транскрипції молекули ДНК, яка транскрибується, на бажаному рівні або за бажаним характером, коли генетична конструкція інтегрована в геном клітини трансгенної рослини. В одному варіанті реалізації цього винаходу молекула ДНК, яка транскрибується, містить область гена, яка кодує білок, а в іншому варіанті реалізації цього винаходу молекула ДНК, яка транскрибується, містить антисмислову область гена.

Гени, які представляють агрономічний інтерес

Молекула ДНК, яка транскрибується, може бути геном, який представляє агрономічний інтерес. Використаний у цьому документі термін «ген, який представляє агрономічний інтерес» належить до молекули ДНК, яка транскрибується, котра при експресії у конкретній тканині рослин, клітині або типі клітини надає бажану характеристику. Продукт гена, який представляє агрономічний інтерес, може діяти всередині рослини для того, щоб впливати на морфологію рослини, фізіологію, ріст, розвиток, врожайність, композицію зерна, поживний профіль, стійкість до хвороб або шкідників та/або толерантність до факторів навколишнього середовища або хімічних факторів, або може діяти в якості пестицидного агента в раціоні шкідника, який харчується рослиною. В одному варіанті реалізації цього винаходу регуляторний елемент за винаходом включений у генетичну конструкцію таким чином, що регуляторний елемент функціонально пов'язаний з молекулою ДНК, яка транскрибується, котра є геном, який представляє агрономічний інтерес. У трансгенній рослині, яка містить таку генетичну конструкцію, експресія гена, який представляє агрономічний інтерес, може надати корисну агрономічну рису. Корисна агрономічна риса може включати, але не обмежується цими, наприклад, толерантність до гербіцидів, боротьбу з комахами, модифікування врожайності, стійкість до хвороб, стійкість до патогена, модифікування росту і розвитку рослини, модифікований вміст крохмалю, модифікований вміст олії, модифікований вміст жирних кислот, модифікований вміст білка, модифіковане дозрівання плодів, покращене харчування тварин і людини, виробництво біополімерів, стійкість до стресових факторів навколишнього середовища, фармацевтичні пептиди, поліпшені властивості для переробки, поліпшення смаку, корисне виробництво гібридного насіння, покращене виробництво волокна і бажане виробництво біопалива.

Приклади генів, які представляють агрономічний інтерес, відомих у цій галузі техніки, включають стійкість до гербіцидів [патенти США № 6803501, 6448476, 6248876, 6225114, 6107549, 5866775, 5804425, 5633435 та 5463175], підвищення врожайності [патенти США № USRE38446, 6716474, 6663906, 6476295, 6441277, 6423828, 6399330, 6372211, 6235971, 6222098 та 5716837], боротьба з комахами [патенти США № 6809078, 6713063, 6686452, 6657046, 6645497, 6642030, 6639054, 6620988, 6593293, 6555655, 6538109, 6537756, 6521442, 6501009, 6468523, 6326351, 6313378, 6284949, 6281016, 6248536, 6242241, 6221649, 6177615, 6156573, 6153814, 6110464, 6093695, 6063756, 6063597, 6023013, 5959091, 5942664, 5942658, 5880275, 5763245 та 5763241], стійкість до грибкових захворювань [патенти США № 6653280, 6573361, 6506962, 6316407, 6215048, 5516671,

5773696, 6121436, 6316407 та 6506962], стійкість до вірусів [патенти США № 6617496, 6608241, 6015940, 6013864, 5850023 та 5304730], стійкість до нематоди [патент США № 6228992], стійкість до бактеріальних захворювань [патент США № 5516671], ріст і розвиток рослин [патенти США № 6723897 і 6518488], накопичення крохмалю [патенти США № 6538181, 6538179, 6538178, 5750876, 6476295], виробництво модифікованих олій [патенти США № 6444876, 6426447 та 6380462], підвищена продукція олій (патенти США № 6495739, 5608149, 6483008 та 6476295), модифікований вміст жирних кислот [патенти США № 6828475, 6822141, 6770465, 6706950, 6660849, 6596538, 6589767, 6537750, 6489461 та 6459018], підвищена продукція білків [патент США № 6380466], дозрівання плодів (патент США № 5512466), покращене харчування тварин і людини [патенти США № 6723837, 6653530, 6541259; 5985605 та 6171640], біополімери [патенти США № USRE37543, 6228623 та 5958745, і 6946588], стійкість до стресових факторів навколишнього середовища [патент США № 6072103], фармацевтичні пептиди і пептиди, які секретуються [патенти США № 6812379, 6774283, 6140075 та 6080560], поліпшені властивості для переробки [патент США № 6476295], поліпшена засвоюваність [патент США № 6531648], з низьким вмістом рафінози [патент США № 6166292], промислове виробництво ферменту [патент США № 5543576], покращений смак [патент США № 6011199], фіксація азоту [патент США № 5229114], виробництво гібридного насіння (патент США № 5689041), виробництво волокна [патенти США № 6576818, 6271443, 5981834 та 5869720] та виробництво біопалива [патент США № 5998700].

В альтернативному варіанті ген, який представляє агрономічний інтерес, може вплинути на вищезгадані характеристики рослини або фенотипи шляхом кодування молекули РНК, яка спричиняє спрямовану модуляцію експресії ендogenous гена, наприклад, через антисмислові [див., наприклад, патент США 5107065], інгібіторні РНК («РНК-інтерференції», які включають модуляцію експресії генів за допомогою мікроРНК-, міРНК-, транс-діючих міРНК- та фазових малих РНК-опосередкованих механізмів, наприклад, як [описано в опублікованих заявках США 2006/0200878 і 2008/0066206 та в заявці на патент США 11/974469], або косупресорно-опосередковані механізми. РНК також може бути каталітичною молекулою РНК (наприклад, рибозимом або рибосвітчем, див., наприклад, опубліковану [заявку США 2006/0200878], розробленою для відщеплення бажаного ендogenous продукту мРНК. У цій галузі техніки відомі способи для розробки та введення генетичних конструкцій в клітину, таким чином, що молекула ДНК, яка транскрибується, транскрибується в молекулу здатну викликати супресію гена.

Експресія молекули ДНК, яка транскрибується, у клітині рослини також може бути використана для супресії шкідників рослин, які харчуються клітинами рослини, наприклад, композиції, виділені з твердокрилих комах-шкідників, і композиції, виділені з нематодних шкідників. Шкідники рослин включають, але не обмежуються цими, членистоногих шкідників, нематодних шкідників та грибкових або мікробних шкідників.

Селективні маркери

Селективні маркерні трансгени також можуть бути використані з регуляторними елементами відповідно до цього винаходу. Використаний у цьому документі термін «селективний маркерний трансген» належить до будь-якої молекули ДНК, яка транскрибується, чия експресія в трансгенній рослині, тканини або клітині, або відсутність таких, може піддаватись скринінгу або підраховуватись якимось чином. Селективні маркерні гени і пов'язані з ними методи відбору та скринінгу, призначені для використання винаходу на практиці, відомі у цій галузі техніки і включають, але не обмежуються цими, молекули ДНК, які транскрибуються, котрі кодують бета-глюкуронідазу (GUS), зелений флуоресцентний білок (GFP), білки, які надають стійкості до антибіотиків і білки, які надають стійкості до гербіцидів.

β-глюкуронідаза

Ген β-глюкуронідази (GUS), який виділено з *Escherichia coli* K-12, являє собою один з найбільш широко використовуваних генів для звітів з біотехнології рослин. Ген GUS *E. coli*, uidA, являє собою частину оперона GUS на бактеріальній хромосомі. Його індукують широким спектром β-D-глюкуронідів. Фермент GUS являє собою екзогідролазу, яка каталізує гідроліз β-D-глюкуронідів на D-глюкуронову кислоту та аглікон. *E. coli* живе в травному тракті хребетних, включаючи людину. Хребетні використовують шлях глюкуронування для детоксикації ксенобіотиків та ендogenous сполук, таких як відходи, стероїди, аліфатичні спирти, феноли, карбонові кислоти, цукор та інші різні метаболіти. Глюкуронування залучає до кон'югування з D-глюкуроною кислотою. Це відбувається головним чином у печінці, але також відбувається в інших тканинах та органах, таких як нирки, надниркові залози, шлунково-кишковий тракт. Глюкуронова кислота, може бути використана в *E. coli*, в якості основного джерела вуглецю та енергії. Отже, білок GUS *E. coli* являє собою засіб, за допомогою якого бактерії можуть руйнувати продукти шляхом глюкуронування в травному тракті хребетних з отриманням глюкуронової кислоти в якості джерела вуглецю та енергії. Аглікони, які також вивільняються GUS ферментом, як правило, не розкладаються бактеріями, але використовується для трансферу D-глюкуронової кислоти [Gilissen et al., *Transgenic Research*, 7: 157-163, 1998].

Використання гена β -глюкуронідази *E. coli* в якості репортера було вперше описане Jefferson *та ін.* [Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 8447-8451, 1986] та надалі її застосовували в практично тому ж вигляді, в якому була вперше представлена. Ген GUS використовується для моніторингу експресії генів рослин та часто використовується для опису промоторів або інших експресійних елементів. Тим не менш, деякі рослинні промотори експресують на дуже низькому рівні, та можуть бути не визначеними з використанням аналізу на основі GUS. Ці промотори, які більш слабо експресують, можуть бути корисні для розвитку трансгенних культур з бажаними ознаками, такими як підвищення врожайності.

На початку розвитку трансгенних рослин сільськогосподарських культур найбажанішими були промотори, які забезпечували високу конститутивну експресію. Такі конститутивні промотори, які були отримані з геномів вірусів рослин, таких як вірус мозаїки цвітної капусти і вірус мозаїки ранника, були використані для контролю трансгенів, на які покладено толерантність до гербіцидів або стійкість до комах. У галузі біотехнології рослин за своєю складністю збільшується розробка нових трансгенних рис, які вимагають більш специфічних патернів експресії або більш низьких рівнів експресії. Надлишкова експресія в невідповідних рослинних тканинах може призвести до небажаних ефектів у трансформованій рослині. Наприклад, зміщена експресія (експресія гена в аномальному місці в організмі) генів ферментів в рослинах може призвести до зменшення бажаного кінцевого продукту через недостачу попередника в точці розгалуження метаболічного шляху [Iwase et al., Plant Biotech. 26: 29-38, 2009].

Так як транскрипційні фактори (TFs), в нормі, виступають в якості основних регуляторів клітинних процесів, вони, як очікується, будуть відмінно підходити для модифікації складних ознак культурних рослин, та TF-технологія, ймовірно, будуть помітною частиною наступного покоління ефективних біотехнологічних культур. TF-технології часто вимагають оптимізації, як зниження небажаних побічних ефектів, таких як затримка росту, так і підвищення бажаних ознак до рівня, при якому вони мають комерційну цінність. Оптимізація часто досягається зміною експресії трансгена TF. Тканеспецифічні, етап-специфічні, або індуковані промотори, а не звичайні конститутивні промотори, можуть бути використані для обмеження експресії трансгена у відповідних тканинах або за умов навколишнього середовища [Century et al., Plant Physiology, 147: 20-29, 2008].

Частково через ці зміни, існує необхідність у більш чутливому аналізі характеру експресії елементів для ідентифікації елементів експресії, які забезпечують необхідний рівень і характер експресії. Даний винахід пропонує поліпшення модифікованого кодону GUS-кодуючої послідовності, функціонально пов'язаної з промотором, які експресують краще, ніж нативна GUS-кодуюча послідовність *E. coli*, яка зазвичай використовується в цій галузі техніки. Покращений модифікований кодон GUS-кодуючої послідовності може бути використаний для забезпечення більшої чутливості якісного та кількісного аналізу та дозволяє характеризувати промотори та інші елементи експресії, яка неможлива з нативною GUS-кодуючою послідовністю *E. coli*. Покращений модифікований кодон GUS-кодуючої послідовності може бути використаний для характеристики елементів експресії в однодольних та дводольних рослинах. Однодольні рослини, які використовували в практичній реалізації цього винаходу, включають, але не обмежуються ними, кукурудзу (*Zea mays*), рис (*Oryza sativa*), пшеницю (*Triticum*), ячмінь (*Hordeum vulgare*), сорго (*Sorghum* spp.), просо, африканське просо (*Pennisetum glaucum*), пальчасте просо (*Eleusine coracana*), просо звичайне (*Panicum miliaceum*), мишій італійський (*Setaria italica*), овес (*Avena sativa*), тритикале, жито (*Secale cereale*), росичку (*Digitaria*), цибулю (*Allium* spp.), ананас (*Ananas* spp.), газонну траву, цукрову тростину (*Saccharum* spp.), пальми (*Arecaceae*), бамбук (*Bambuseae*), банани (*Musaceae*), імбирні (*Zingiberaceae*), лілії (*Lilium*), нарциси (*Narcissus*), півники (*Iris*), амарилліси, орхідеї (*Orchidaceae*), канни, дзвіночки (*Hyacinthoides*) та тюльпани (*Tulipa*). Дводольні рослини, які використовували в практичній реалізації цього винаходу, включають, але не обмежуються ними, сою (*Glycine max*), дику сою (*Glycine soja*), бавовник (*Gossypium*), томати (*Solanum lycopersicum*), перець (*Piper*), гарбуз (*Cucurbita*), горох (*Pisum sativum*), люцерну (*Medicago sativa*), *Medicago truncatula*, квасолю (*Phaseolus*), нут (*Cicer arietinum*), соняшник (*Helianthus annuus*), картоплю (*Solanum tuberosum*), арахіс (*Arachis hypogaea*), кінву, гречку посівну (*Fagopyrum esculentum*), ріжкове дерево (*Ceratonia siliqua*), буряк (*Beta vulgaris*), шпинат (*Spinacia oleracea*) та огірок (*Cucumis sativus*).

Трансформація клітин

Винахід також спрямовується до способу отримання трансформованих клітин та рослин, які містять один або більше регуляторних елементів, функціонально пов'язаних з молекулою ДНК, яка транскрибується.

Термін «трансформація» належить до введення молекули ДНК до реципієнтного хазяїна. Використаний у цьому документі термін «хазяїн» належить до бактерій, грибів або рослин, включаючи будь-які клітини, тканини, органи, або до нащадків бактерій, грибів або рослин. Тканини та клітини рослин, які представляють особливий інтерес, включають протопласти, калюс, корені, бульби, насіння, стебла, листя, паростки, зав'язі та пилок.

Використаний у цьому документі термін «трансформований» належить до клітини, тканини, органу або організму, в який молекула чужорідної ДНК, така як генетична конструкція, була введена.

Введена молекула ДНК може бути інтегрована в геномну ДНК клітини, тканини, органу або організму реципієнта таким чином, що введена молекула ДНК успадковується надалі у нащадків. «Трансгенна» або «трансформована» клітина або організм також може включати нащадків клітини або організму і нащадків, отриманих в результаті програми розмноження з використанням такого трансгенного організму як батьківської форми при схрещуванні, та проявляє змінений фенотип як результат присутності чужорідних молекул ДНК. Введена молекула ДНК також може бути тимчасово введеною в клітину-реципієнт таким чином, що введена молекула ДНК не успадковується надалі у нащадків. Термін «трансгенний» належить до бактерії, гриба або рослини, які містять одну або більше гетерологічних молекул ДНК.

Існує багато способів, добре відомих фахівцям у цій галузі техніки, для введення молекули ДНК у клітини рослин. Процес, як правило, включає етапи вибору відповідної клітини-хазяїна, трансформації клітини-хазяїна вектором та отримання трансформованої клітини-хазяїна. Методи та матеріали для трансформації клітин рослин через введення рослинної генетичної конструкції у геном рослин, у реалізації винаходу на практиці, можуть включати будь-який із відомих і показаних способів. Відповідні способи включають, але не обмежуються цими, бактеріальну інфекцію (наприклад, *Agrobacterium*), бінарні БШХ вектори, пряме перенесення ДНК (наприклад, ПЕГ-опосередковану трансформацію, поглинання ДНК, опосередковане висушуванням/інгібуванням, електропорацію, перемішування із волокнами карбиду кремнію та прискорення частинок, вкритих ДНК) із числа інших.

Клітини-хазяїни можуть являти собою будь-яку клітину або організм, наприклад, клітину рослини, клітину водорості, водорості, клітину гриба, гриби, бактеріальну клітину чи клітинку комах. У конкретних варіантах реалізації цього винаходу клітини-хазяїни та трансформовані клітини можуть включати клітини культурних рослин.

Трансгенна рослина згодом може бути регенерована із клітини трансгенної рослини відповідно до цього винаходу. Із використанням загальноприйнятих методів розмноження або самозапилення можна отримати насіння із цієї трансгенної рослини. Таке насіння та отримана в результаті рослина-нащадок, вирощена із такого насіння, будуть містити рекомбінантну молекулу ДНК відповідно до цього винаходу і, отже, будуть трансгенними.

Трансгенні рослини відповідно до цього винаходу можуть бути самозапилені, для надання насіння гомозиготних трансгенних рослин за винаходом (гомозиготних за рекомбінантною молекулою ДНК), або схрещені з нетрансгенними рослинами або іншими трансгенними рослинами, для надання насіння гомозиготних трансгенних рослин за винаходом (гомозиготних за рекомбінантною молекулою ДНК). Як гомозиготні, так і гетерозиготні трансгенні рослини згадуються в цьому документі як «рослини-нащадки». Рослини нащадки являють собою трансгенні рослини, які походять від вихідної трансгенної рослини і містять рекомбінантну молекулу ДНК відповідно до цього винаходу. Насіння, отримане з використанням трансгенної рослини відповідно до цього винаходу, може бути зібране і використане для вирощування поколінь трансгенних рослин, тобто рослин-нащадків відповідно до цього винаходу, які включають генетичну конструкцію цього винаходу та експресію гена, який представляє агрономічний інтерес. Описи способів розмноження, які зазвичай використовуються для різних культур, можуть бути знайдені в одному із декількох книжкових посилань, див., наприклад, [Allard, *Principles of Plant Breeding*, John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98 (1960); Simmonds, *Principles of Crop Improvement*, Longman, Inc., NY, 369-399 (1979); Sneep and Hendriksen, *Plant breeding Perspectives*, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, *Soybeans: Improvement, Production and Uses*, 2nd Edition, Monograph, 16: 249 (1987); Fehr, *Principles of Variety Development, Theory and Technique*, (Vol. 1) і *Crop Species Soybean* (Vol.2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987)].

Трансформовані рослини можуть бути проаналізовані на наявність цільового гена або генів і за рівнем експресії та/або профілем, наданим регуляторними елементами за винаходом. Фахівцям у цій галузі техніки відомі численні способи, доступні для аналізу трансформованих рослин. Наприклад, методи аналізу рослин включають, але не обмежуються цими, Саузерн блот або нозерн блот, підходи на основі ПЛР, біохімічні аналізи, способи фенотипічного скринінгу, польові апробації та імунодіагностичні аналізи. Експресія молекули ДНК, яка транскрибується, може бути виміряна з використанням реагентів TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) та за способами, описаним виробником, і за кількістю циклів ПЛР, визначеною з використанням TaqMan® Testing Matrix. В альтернативному варіанті реагенти Invader® [Third Wave Technologies, Madison, WI] та способи, описані виробником, можуть бути використані для оцінки експресії трансгена.

Винахід також належить до частин рослини відповідно до цього винаходу. Частини рослин включають, але не обмежуються цими, листя, стебла, корені, бульби, насіння, ендосперм, сім'ябруньку та пилок. Частини рослин відповідно до цього винаходу можуть бути життєздатними, нежиттєздатними, здатними та/або не здатними до регенерації. У винаході також включені та запропоновані трансформовані клітини рослини, що містять молекулу ДНК відповідно до цього винаходу. Трансформовані клітини або клітини трансгенної рослини за винаходом включають клітини здатні та/або не здатні до регенерації.

Винахід може бути більш легко зрозумілим через посилання на наступні приклади, які запропоновані в якості ілюстрації і не призначаються для обмеження винаходу, якщо це не встановлено. Фахівцям у цій галузі техніки повинно бути зрозуміло, що способи, описані в наступних прикладах, являють собою способи, виявлені авторами винаходу, для нормального функціонування при застосуванні винаходу. Однак фахівцям у цій галузі техніки повинно бути зрозуміло, у висвітленні цього опису, що численні зміни можуть бути зроблені в конкретних описаних варіантах реалізації винаходу, і, як і раніше, вийде схожий або аналогічний результат без відступу від сутності та обсягу винаходу, тому все, що має значення, розміщується далі або показується у доданих графічних матеріалах і повинно інтерпретуватися в ілюстративному, а не обмежуючому розумінні.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1

Ідентифікація та клонування регуляторних елементів

Нові RCc3 промотори та лідери були ідентифіковані та клоновані з геномної ДНК однодольних видів: *СЛЬОЗНИКА* (*Coix lacryma-jobi*), *пальчатки кров'яної* (*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.), *міскантусу китайського* (*Miscanthus sinensis* f. *gracillimus*), *тріпсакума дводомного* (*Tripsacum dactyloides*) та *цукрової тростини* (*Saccharum officinarum*). Білок RCc3 належить надродині проламінів, яка отримала свою назву від спирторозчинного проліну та баратого на глютамін білка зернових. Надродина проламіни (також називається інгібітором протеази / білка-переносника ліпідів / збереження насіння родини 2S альбуміну; Pfam ID: PF00234) являє собою одне з найпоширеніших надродин білків в геномі рослини. Членами надродини проламінів рясніють фрукти, горіхи, насіння та овочі у різноманітних рослин. Вони, як відомо, виявляють різноманітні функції: зберігання та захист насіння, зв'язування або передача ліпідів, та інгібування ферментів. Білки-переносники ліпідів (LTPs) належать до надродини проламінів та експресуються в різних рослинних тканинах. Білок рису RCc3 являє собою LTP, що експресується в коренях рису, хоча і не всі білки LTP корінь-специфічні.

Праймери ампліфікації ДНК (які представлені у SEQ ID №: 25-28) були розроблені з використанням кодуєчих послідовностей двадцяти чотирьох (24) LTP білків з *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor* та *Brachypodium distachyon*. Праймери ампліфікації були використані з Genome Walker™ [Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA], бібліотеками, побудованими для клонування 5' області відповідної послідовності геномної ДНК.

Біоінформативний аналіз проводили для виявлення регуляторних елементів у межах ампліфікованої ДНК. Використовуючи результати цього аналізу, регуляторні елементи були визначені в межах послідовностей ДНК та праймерів, розроблених для ампліфікації регуляторних елементів. Відповідну молекулу ДНК для кожного регуляторного елемента ампліфікували з використанням стандартних умов полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із праймерами, що містять унікальні сайти рестрикції, і геномної ДНК, виділеної з *C. lacryma-jobi*, *D. sanguinalis* (L.) Scop., *M. sinensis* f. *gracillimus*, *T. dactyloides* та *S. officinarum*. Отримані фрагменти ДНК були ліговані в вектори та секвеновані.

Послідовності ДНК, ідентифікованих промоторів та лідерів RCc3 наведені в таблиці 1. Промоторні послідовності запропоновані в цьому документі в якості SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19. Лідерні послідовності запропоновані в цьому документі як SEQ ID №: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 та 20.

Таблиця 1

Промоторні та лідерні послідовності RCc3, ізольовані з різних видів трав

Опис послідовності	SEQ ID №:	Рід/вид
P-Cl.RCc3:3	1	Coix lacryma-jobi
L-Cl.RCc3:2	2	Coix lacryma-jobi
P-Ds.RCc3_1:1	3	Digitaria sanguinalis (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_1:1	4	Digitaria sanguinalis (L.) Scop.
P-Ds.RCc3_2:1	5	Digitaria sanguinalis (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_2:1	6	Digitaria sanguinalis (L.) Scop.
P-Ds.RCc3_3:1	7	Digitaria sanguinalis (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_3:1	8	Digitaria sanguinalis (L.) Scop.
P-MISgr.RCc3_1:1	9	Miscanthus sinensis f. gracillimus
L-MISgr.RCc3_1:1	10	Miscanthus sinensis f. gracillimus
P-MISgr.RCc3-2:2	11	Miscanthus sinensis f. gracillimus
L-MISgr.RCc3-2:1	12	Miscanthus sinensis f. gracillimus
P-Td.RCc3_1:1	13	Tripsacum dactyloides
L-Td.RCc3_1:1	14	Tripsacum dactyloides
P-Td.RCc3_2:1	15	Tripsacum dactyloides
L-Td.RCc3_2:1	16	Tripsacum dactyloides
P-Td.RCc3_3:1	17	Tripsacum dactyloides
L-Td.RCc3_3:1	18	Tripsacum dactyloides
P-So.RCc3:2	19	Saccharum officinarum
L-So.RCc3:2	20	Saccharum officinarum

Приклад 2

Аналіз регуляторних елементів, які контролюють GUS в трансгенній кукурудзі

Рослини кукурудзи були трансформовані із застосуванням векторів, спеціальних бінарних плазмідних конструкцій, що містять промотор RCc3, функціонально пов'язаний з його нативною лідерною послідовністю RCc3, яка керує експресією трансгенної (GUS) β -глюкуронідази. Отримані трансформовані рослини аналізували на GUS-експресію білка.

Вектори, якіц використовували в цих експериментах, були сконструйовані з використанням способів клонування, які добре відомі у цій галузі техніки. Отримані вектори, що містять праву граничну область із *A. tumefaciens*; першу експресійну касету для аналізу промоторної/лідерної послідовності RCc3, функціонально пов'язаної з кодоном модифікованої GUS-кодуючої послідовності, яка містить смисловий інтрон GOI-*Ec.uidA+St.LS1.nno:3* (SEQ ID №:29), котра функціонально пов'язана з 5' кінцем 3' НТО із гена S- аденозілметіонін синтетази 1 проса італійського (T-SETit.Ams1-1: 1: 1, SEQ ID №: 159); другу експресійну касету, використану для відбору трансформованих клітин рослини, яка надає стійкості к гліфосату (під контролем промотору актину 1 рису) та ліву граничну область із *A. tumefaciens*. Отримані плазмідні були використані для трансформації рослин кукурудзи з використанням методів, відомих в цій галузі техніки. Експресія GUS, обумовлена новими промоторами та лідерами RCc3, була зрівняна з експресією, керованої гомологами промоторів та лідерів RCc3 проса італійського та рису. У таблиці 2 наведені позначення плазмід, промоторні та лідерні послідовності RCc3,i SEQ ID №.

Таблиця 2

Бінарні плазмідні для трансформації рослин та RCc3-асоційовані промоторні/лідерні послідовності

Плазмідна конструкція	Опис послідовності промотора	SEQ ID №:	Опис послідовності лідера	SEQ ID №:
pMON264146	P-Cl.RCc3:3	1	L-Cl.RCc3:2	2
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1	3	L-Ds.RCc3_1:1	4
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1	5	L-Ds.RCc3_2:1	6
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1	7	L-Ds.RCc3_3:1	8
pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1	9	L-MISgr.RCc3_1:1	10
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2	11	L-MISgr.RCc3-2:1	12
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1	13	L-Td.RCc3_1:1	14
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1	15	L-Td.RCc3_2:1	16
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1	17	L-Td.RCc3_3:1	18
pMON264166	P-So.RCc3:2	19	L-So.RCc3:2	20
pMON264108	P-SETit.Rcc3-1:1:10	21	L-SETit.Rcc3-1:1:2	22
pMON264206	P-Os.Rcc3-1:1:24	23	L-Os.Rcc3-1:1:2	24

Рослини були трансформовані шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, відомих в цій області техніки та описаних в публікації заявки на патент США 2009/0138985.

Гістохімічний аналіз GUS був використаний для якісного аналізу експресії трансформованих рослин. Ділянки цілісної тканини інкубували з GUS забарвлюючим розчином X-Gluc (5-бром-4-хлор-3-індоліл-бета-глюкуронід) (1 мг/мл) протягом відповідного періоду часу, промивали та перевіряли візуально за синім забарвленням. GUS активність якісно визначали шляхом прямої візуальної перевірки або перевірки під мікроскопом, використовуючи вибрані органи і тканини рослини. R₀ рослини були перевірені щодо експресії у коренях і листках, а також у пиляку, маточкових стовпчиках та насінні, що розвивається, та зав'язі через 21 день після запилення (21 ДПЗ).

Для кількісного аналізу, загальний білок екстрагували з обраних тканин трансформованих рослин кукурудзи. Один мікрограм загального білка був використаний із флюорогенним субстратом 4-метилумбеліферил- β -D-глюкуронідом (MUG) у загальному об'ємі реакції 50 мкл. Продукт реакції, 4-метилумбеліферон (4-MU), максимально флуоресцює при високих значеннях рН, де гідроксильна група іонізується. Додавання лужного розчину карбонату натрію одночасно зупиняє реакцію і доводить рН для кількісного вимірювання флуоресцентного продукту. Флуоресценцію вимірювали при довжині хвилі збудження 365 нм, випромінювання – 445 нм з використанням Fluoromax-3 (Horiba; Кіото, Японія) з Micromax Reader, з встановленою шириною щілини: 2 нм – на збудження і 3 нм – на випромінювання. Середні значення експресії були надані в пмоль/мкг 4-MU білка/год.

Середнє значення експресії R₀ GUS для кожної трансформації було записано, та середній рівень експресії та стандартну помилку визначали на підставі вимірів зразків, отриманих з декількох подій

трансформації.

Приклад 3

Енхансери, які походять від регуляторних елементів.

Енхансери походять із промоторних елементів, запропонованих у цьому винаході, таких, які представлені в SEQ ID №: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 та 19. Ці енхансерні елементи можуть містити один або більше цис регуляторних елементів, які у разі, коли вони функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із промоторним елементом або функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із додатковими енхансерними елементами, які функціонально пов'язані з промотором, можуть підвищувати або модулювати експресію молекули ДНК, яка транскрибується, або забезпечувати експресію молекули ДНК, яка транскрибується, в конкретному типі клітин або органі рослини, або у конкретній часовій точці у розвитку або циркадному ритмі. Енхансери створюють шляхом видалення ТАТА-боксу або функціонально подібних елементів та будь-якої послідовності ДНК, яка знаходиться нижче, із промоторів, що дозволяє ініціювати транскрипцію з промоторів, описаних у цьому документі, як описано вище, в тому числі їхніх фрагментів, з яких видалені ТАТА-бокс або функціонально подібні елементи та послідовність ДНК, яка знаходиться нижче від ТАТА-боксу.

Енхансерні елементи можуть бути отримані з промоторних елементів, описаних у цьому документі, і клоновані з використанням способів, відомих у цій галузі техніки, таким чином, щоб вони були функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із промоторним елементом або функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із додатковими енхансерними елементами, які функціонально пов'язані з промотором. Енхансерні елементи також можуть бути клоновані таким чином, щоб вони були функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із промоторним елементом, отриманим з організму іншого роду, або функціонально пов'язані через 5' або 3' кінець із додатковими енхансерними елементами, отриманими з організмів іншого роду або організму того самого роду, які функціонально пов'язані з промотором, отриманим з організму того самого або іншого роду, в результаті чого утворюється химерний регуляторний елемент. Експресійний вектор з геном GUS для трансформації рослин створений із використанням способів, відомих у цій галузі техніки, подібно генетичним конструкціям, описаним у попередніх прикладах, в яких кінцеві рослинні експресійні вектори містять праву граничну область з *A. tumefaciens*; першу експресійну касету для тестування регуляторного або химерного регуляторного елемента, яка містить регуляторний або химерний регуляторний елемент, функціонально пов'язаний з інтроном, отриманим із білка теплового шоку HSP70 з *Z. mays* (I-Zm.DnaK-1:1:1 SEQ ID №: 38) або з будь-яким з інтронів, представлених у цьому документі, або з будь-яким іншим інтроном, функціонально пов'язаним із кодуючою послідовністю GUS, яка або має інтрон, який вирізається (GUS-2, SEQ ID №: 32) або не має інтрону (CR- Ec.uidA-1:1:4 (GUS.nat), SEQ ID №: 31), котра функціонально пов'язана з 3' НТО нопалінсинтази з *A. tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID №: 39) або з 3' НТО із гена білка перенесення ліпідів рису (T-Os.LTP-1:1:1, SEQ ID №: 40), другу касету для селекції трансгена, використану для відбору трансформованих клітин рослини, яка надає стійкість до гербіциду гліфосату (під контролем промотору актину 1 рису) або, в альтернативному варіанті, до антибіотика канаміцину (під контролем промотору актину 1 рису) і ліву граничну область з *A. tumefaciens*. Отримані плазмідні використовують для трансформації рослин кукурудзи або інших рослин цього роду за допомогою способів, описаних раніше, або інших способів, які відомі у цій галузі техніки. В альтернативному варіанті клітини протопластів, отримані з кукурудзи або інших рослин роду, трансформують за допомогою способів, відомих у цій галузі техніки, для проведення аналізу транзійтної експресії

Експресія гена GUS під контролем регуляторного елемента, який містить один або більше енхансерів, оцінюється при випробуваннях рослин зі стабільною трансформацією або із транзійтною експресією для визначення впливу енхансерного елемента на експресію трансгена. Модифікації одного або більше енхансерних елементів або дуплікація одного або більше енхансерних елементів здійснюється на основі емпіричних досліджень та кінцевої регуляції експресії генів, яка спостерігається при використанні композиції кожного регуляторного елемента. Зміна відносних позицій одного або більше енхансерів у кінцевому регуляторному або химерному регуляторному елементі може впливати на транскрипційну активність або специфічність регуляторного або химерного регуляторного елемента і визначається емпірично, для визначення найкращих енхансерів для бажаного профілю експресії трансгена в межах рослини кукурудзи або рослини іншого роду.

Приклад 4

Підвищення аналітичної чутливості при використанні кодон-модифікованої β -глюкоронідази (GUS)

Промотори рослин часто експресують на рівнях, які нижче нормального рівня виявлення багатьох кількісних аналізів, але їх характеристики експресії можуть бути дуже цінними для експресії певних трансгенів. Раніше в біотехнології рослин промотори, які давали високу конститутивну експресію були бажаними та їх використовували для регуляції транскрипції молекул ДНК, які відповідали за конкретну ознаку, що вимагає високу конститутивну експресію, таку як стійкість до гербіцидів або стійкість до комах. Ці висококонститутивні промотори часто створюють з геномів вірусів рослин, а не геномів рослин, наприклад, промотори 35S, отримані з вірусу мозаїки цвітної капусти та вірусу

мозаїки ранника. Примітно, що в деяких випадках, висока конститутивна експресія генів певних молекул ДНК, які транскрибуються, може призвести до негативних наслідків, таких як сайленсінг трансгенів off-phenotypes або yield drag. Наприклад, високий рівень експресії гена GUS в трансгенних рослинах цукрової тростини в яких використовуються два різних промотора убіквітину, отримані з цукрової тростини, а також з кукурудзи, призводить до посттранскрипційного сайленсінга гена GUS [Wei et al., J. Plant Physiol. 160: 1241-1251, 2003].

Крім того, останнім часом необхідні промотори, які демонструють конкретні патерни експресії або підвищують експресію в конкретних тканинах рослини. Наприклад, ектопічна експресія генів ферментів в рослинах може призвести до зниження бажаного кінцевого продукту через недостачу попередника в точці розгалуження метаболічного шляху [Iwase et al., Plant Biotech. 26:29-38, 2009]. У цих випадках бажано використовувати промотор, який експресує функціонально пов'язану молекулу ДНК, яка транскрибує, в правильних типах тканин або клітин, або в певному вікні розвитку. Промотори, отримані з геномів рослин, часто демонструють експресію в конкретних клітинах, тканинах або на необхідному етапі. Через більш низькі рівні експресії цих рослинних промоторів, аналізи експресії часто вимагають використання енхансерів, для підвищення рівня експресії, щоб забезпечити виявлення в кількісному аналізі. Тим не менше, використання таких енхансером часто змінює загальний характер експресії.

Підвищення експресії гена-репортера, який використовують в аналізі, усуває необхідність у посиленні промотора рослинного походження та, таким чином, забезпечує більш точну оцінку характеру експресії, наданої промотором. Цей приклад демонструє використання модифікованого кодону GUS-кодуючої послідовності, з метою поліпшення кількісної чутливості аналізу при дослідженні декількох різних EXP, що складаються з промоторної послідовності, функціонально пов'язаної 5' кінцем з лідерною послідовністю, функціонально пов'язаної 5' кінцем з послідовністю інтрона.

Рослини кукурудзи були трансформовані зі застосуванням рослинних векторів, що містять послідовності EXP, які контролюють експресію трансгена нативної β -глюкоронідази (GUS) *Escherichia coli*, так і кодон-модифікованим трансгеном β -глюкоронідази (GUS.nno), та отримані рослини були проаналізовані на експресію GUS білка. Кодуючі EXP та GUS послідовності клонували в бінарні плазмідні конструкції зі застосуванням способів, відомих в цій галузі техніки.

Отримані експресійні рослинні конструкції містять праву граничну ділянку від *A. tumefaciens*; першу трансгенну касету для аналізу чутливості двох послідовностей, що кодують GUS, що складаються з EXP, функціонально пов'язаної з будь-якою нативною послідовністю *E. coli*, що кодує GUS (CR-Ec.uidA-1: 1: 4 (GUS.nat), SEQ ID №: 31) або кодон-модифікованої послідовності, що кодує GUS (CR-Ec.uidA_nno-1: 1: 1 (GUS.nno), SEQ ID №: 30), функціонально пов'язану 5' кінцем з 3' НТО гена білка-переносника ліпідів рису (T-Os.LTP-1: 1: 1, SEQ ID №: 40); друга трансгенна експресійна касета, яку використовували для відбору трансформованих рослинних клітин, які проявляють стійкість до гліфосату (яка керується промотором актину рису 1); та ліва гранична ділянку від *A. tumefaciens*. Фіг. 1A-1C ілюструють вирівнювання між нативною послідовністю, що кодує GUS (CR-Ec.uidA-1: 1: 4), та кодон-модифікованою послідовністю, що кодує GUS (CR-Ec.uidA_nno-1: 1: 1). Ідентичні нуклеотиди у вирівнюванні відзначені зірочкою. Кодон-модифікована послідовність, що кодує GUS, на 77,9% ідентична нативній послідовності, що кодує GUS, та була розроблена для кращої експресії в рослині.

Три (3) різні класи EXP були використані, при цьому кожен проявляв специфічний патерн експресії. EXP EXP-SETit.Cab3 + Zm.DnaK: 1: 1 (SEQ ID №: 34) та EXP-SETit.Cab3 + Zm.DnaK: 1: 2 (SEQ ID №: 35) проявляли профіль експресії в листках кукурудзи та були по суті ідентичні, за винятком вставки в п'ять нуклеотидів 5' CCGGA-3' в позиції 1408-1412 EXP-SETit.Cab3 + Zm.DnaK: 1: 2. Послідовність EXP EXP-CaMV.35S-ENH + Os.Rcc3 + Zm.DnaK: 1: 5 (SEQ ID №: 36) забезпечує підвищений профіль експресії в коренях кукурудзи. Послідовність EXP EXP-Zm.UbqM1: 1: 2 (SEQ ID №: 37) забезпечує висококонститутивний профіль експресії у кукурудзи. Отримані плазмідні конструкції були використані для трансформації рослин кукурудзи зі застосуванням способів, відомих в цій галузі техніки. У таблиці 3 наведені позначення плазмідних конструкцій і відповідні послідовності EXP та GUS.

Таблиця 3

Плазмідні конструкції, послідовності EXP та патерни експресії, які використовували для порівняння нативних GUS та кодон-модифікованих GUS-кодуючих послідовностей

Плазмідна конструкція	Опис EXP	Патерн експресії	SEQ ID №:	GUS	SEQ ID №:
pMON122599	EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:2	Лист	35	CR-Ec.uidA-1:1:4	31

pMON122595	EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:1	Лист	34	CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	30
pMON144050	EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5	Посилений в корені	36	CR-Ec.uidA-1:1:4	31
pMON122597	EXP-CaMV.35S-enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5	Посилений в корені	36	CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	30
pMON144051	EXP-Zm.UbqM1:1:2	Конститутивний	37	CR-Ec.uidA-1:1:4	31
pMON122598	EXP-Zm.UbqM1:1:2	Конститутивний	37	CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	30

У деяких випадках рослини були трансформовані за допомогою агробактеріальних способів трансформації, відомих у цій області техніки та в публікації заявки на патент США 2009/0138985.

Гістохімічний аналіз GUS був використаний для якісного аналізу експресії трансформованих рослин. Ділянки цілісної тканини інкубували з GUS забарвлюючим розчином X-Gluc (5-бром-4-хлор-3-індоліл-бета-глюкуронід) (1 мг/мл) протягом відповідного періоду часу, промивали та перевіряли візуально за синім забарвленням. GUS активність якісно визначалася шляхом прямої візуальної перевірки або перевірки під мікроскопом, використовуючи вибрані органи та тканини рослини. R₀ рослини були перевірені щодо експресії у коренях і листках, а також у пиляку, приймочки та насінні, що розвивається, та зав'язі через 21 день після запилення (21 ДПЗ).

Для кількісного аналізу, загальний білок екстрагували з обраних тканин трансформованих рослин кукурудзи. Один мікрограм загального білка був використаний із флюорогенним субстратом 4-метилумбеліферил-β-D-глюкуронідом (MUG) у загальному об'ємі реакції 50 мкл. Продукт реакції, 4-метилумбеліферон (4-MU), максимально флуоресцює при високих значеннях pH, де гідроксильна група іонізується. Додавання лужного розчину карбонату натрію одночасно зупиняє реакцію і доводить pH для кількісного вимірювання флуоресцентного продукту. Флуоресценцію вимірювали при довжині хвилі збудження 365 нм, випромінювання – 445 нм з використанням Fluoromax-3 (Horiba; Кіото, Японія) з Micromax Reader, з встановленою шириною щілини: 2 нм – на збудження і 3 нм – на випромінювання.

Середня експресія GUS в R₀, яку спостерігали для кожної трансформації, представлена нижче в таблицях 4, 5 та 6.

Таблиця 4

Середнє значення експресії GUS для покоління трансформантів R₀ нативних та кодон-модифікованих GUS-кодуючих послідовностей з використанням EXP з профілем експресії в листках

Тканина	pMON122599 EXP- SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:2/CR- Ec.uidA-1:1:4	pMON122595 EXP-SETit.Cab3+Zm.DnaK:1:1/CR- Ec.uidA_nno-1:1:1
V4 Лист	798	1807
V7 Лист	230	1863
VT Лист	508	2097
V4 Корінь	0	0
V7 Корінь	0	0
VT Корінь	14	0
Пильник	95	1056
Маточка	154	1590
21ДПЗ Зародок	24	31
21 ДПЗ Ендосперм	18	61

Таблиця 5. Середнє значення експресії GUS для покоління трансформантів R₀ нативних та кодон-модифікованих GUS-кодуючих послідовностей з використанням EXP з посиленою експресією в коріннях.

Таблиця 5

Тканина	pMON144050 EXP-CaMV.35S-	pMON122597 EXP-CaMV.35S-
---------	-----------------------------	-----------------------------

	enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5/CR-Ec.uidA-1:1:4	enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5/CR-Ec.uidA_nno-1:1:1
V4 Лист	0	50
V7 Лист	0	51
VT Лист	0	82
V4 Корінь	26	486
V7 Корінь	16	257
VT Корінь	18	343
Пильник	19	67
Маточка	0	12
21ДПЗ Зародок	14	125
21 ДПЗ Ендосперм	17	45

Таблиця 6. Середнє значення експресії GUS для покоління трансформантів R₀ нативних та кодон-модифікованих GUS-кодуючих послідовностей з використанням EXP з конститутивним рівнем експресії.

Таблиця 6

Тканина	pMON144051 EXP-Zm.UbqM1:1:2/CR-Ec.uidA-1:1:4	pMON122598 EXP-Zm.UbqM1:1:2/CR-Ec.uidA_nno-1:1:1
V4 Лист	988	3327
V7 Лист	963	2771
VT Лист	1777	3787
V4 Корінь	693	2149
V7 Корінь	402	1443
VT Корінь	776	3170
Пильник	2247	3190
Маточка	975	3324
21ДПЗ Зародок	511	894
21 ДПЗ Ендосперм	791	2298

Як видно з таблиць 4, 5 та 6, існує можливість підвищити чутливість кількісного аналізу з використанням кодон-модифікованої GUS-кодуючої послідовності в порівнянні з нативною кодуючою послідовністю GUS. Деякі зміни між популяціями GUS.nno та GUS.nat слід очікувати, оскільки експресія може залежати від вставки ділянок Т-ДНК; однак загальна тенденція чутливості показує набагато більше чутливості, при використанні GUS.nno. GUS, яка контролюється EXP-SETit.Cab3 + Zm.DnaK: 1: 1 (SEQ ID №: 34) та EXP-SETit.Cab3 + Zm.DnaK: 1: 2 (SEQ ID №: 35), продемонстрували в 2,26-8,1 рази більшу чутливість із застосуванням GUS.nno, ніж у випадку з GUS.nat. Аналогічним чином, забезпечується посилена експресія в корені EXP-CaMV.35S-Enh + Os.Rcc3 + Zm.DnaK: 1:5 (SEQ ID №: 36) в 16,06-19,06 рази за допомогою GUS.nno, ніж GUS.nat, завдяки чому кодон-модифікована GUS-кодируюча послідовність ідеально підходить для скринінгу кореневих промоторів, особливо тих, які експресують на низькому рівні, та можуть демонструвати рівень GUS на рівні або нижче фонових рівнів при використанні нативної GUS послідовності, кодуючої 8.1 кратно більшу чутливість за допомогою GUS.nno. Висококонститутивний профіль експресії, який забезпечується EXP-Zm.UbqM1: 1: 2 (SEQ ID №: 37), продемонстрував у 1,42-4,09 рази вищий рівень з використанням GUS.nno, у порівнянні з GUS.nat.

Якісна GUS-реакція була більш чутлива і краще спостерігалася при використанні кодон-модифікованої GUS-кодуючої послідовності. Як правило, якісні реакції фарбування менш чутливі, ніж кількісні аналізи. Використання кодон-модифікованої GUS-кодуючої послідовності забезпечує кращі та більш однорідні мікроскопічні перевірки забарвлених тканин. Наприклад, в тканинах коренів, де GUS керується EXP-CaMV.35S-Enh + Os.Rcc3 + Zm.DnaK: 1: 5 (SEQ ID №: 36), гістохімічне фарбування тканин, які трансформовані кодон-модифікованою GUS-кодуючою послідовністю, був більш вираженим та видимим у всіх зразках V7 кореня: корі, епідермі, ендодермі, корневих волосках і кінчиках бічних коренів. На противагу цьому, GUS фарбування якісно не спостерігалася у відповідних V7 тканинах кореня, коли нативною GUS-кодуючою послідовністю керували за допомогою EXP-CaMV.35S- Enh + Os.Rcc3 + Zm.DnaK: 1: 5. Покращена кодон-модифікована GUS-кодируюча послідовність (CR-Ec.uidA_nno-1: 1: 1, SEQ ID №: 30), забезпечує більшу чутливість аналізу та являю собою особливо цінну при вимірюванні експресії промоторів, які експресують на низькому рівні.

Приклад 5

Аналіз регуляторних елементів, які контролюють GUS в протопластах коріння та листків кукурудзи [000108] Протопласти листків та коріння кукурудзи були трансформовані за допомогою векторів,

що містять RCc3 промотор, функціонально пов'язаний з нативним лідером RCc3, який контролює експресію трансгена β -глюкуронідази (GUS), і в результаті трансформовані протопласти були проаналізовані на експресію білка GUS. RCc3 промоторні та лідерні послідовності були клоновані в бінарні плазмідні конструкції з використанням способів, відомих в цій області техніки та описаних раніше в Прикладі 2.

Також було побудовано дві плазмідні для використання при ко-трансформації та нормуванні даних, з використанням способів, відомих в цій галузі техніки. Кожна плазміда містила специфічну послідовність, що кодує люциферази, під контролем конститутивної послідовності EXP. Рослинний вектор pMON19437 містить експресійну касету з конститутивним промотором, функціонально пов'язаним з 5' інтроном, (EXP-CaMV.35S-enh + Zm.DnaK: 1: 1, SEQ ID №: 41), функціонально пов'язаним з 5' кодуючою послідовністю люциферази світляка (*Photinus pyralis*) (LUCIFERASE: 1: 3, SEQ ID №: 42), функціонально пов'язаною з 5'-3' НТО з гена нопалінсінтази *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1: 1: 13, SEQ ID №: 39). Рослинний вектор pMON63934 містить експресійну касету з конститутивною послідовністю EXP (EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1, SEQ ID №: 44), функціонально пов'язаною з 5' кодуючою послідовністю люциферази ренілі морської (*Renilla reniformis*) (CR-Ren.hRenilla Lucife -0: 0: 1, SEQ ID NO: 43), функціонально пов'язаною з 5'-3' НТО з гена нопалінсінтази *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1: 1: 13, SEQ ID №: 39).

Протопласти листків та коренів кукурудзи були трансформовані з використанням способу трансформації на основі ПЕГ, який добре відомий у цій галузі техніки. Клітини протопластів трансформували плазмідними ДНК pMON19437 та pMON63934 та плазмідами, представленими в таблиці 7, та інкубували протягом ночі у повній темряві. Надалі вимірювання як GUS, так і люциферази проводили шляхом внесення аліквот лізованих препаратів клітин, трансформованих як описано раніше, у два різних планшети із дрібними лунками. Один планшет використовували для вимірювання GUS, а другий планшет використовували для виконання подвійного аналізу люциферази з використанням системи подвійного аналізу репортеру люциферази (Promega Corp., Madison, WI; див., Наприклад, Promega Notes Magazine, No: 57, 1996, p.02).

Чотири трансформації були виконані для кожного EXP або промотора + лідера + послідовності інтрона. Були визначені середні значення експресії для кожної послідовності EXP або промотора + лідера + послідовності інтрона з декількох зразків кожного експерименту з трансформації. Вимірювання зразків були проведені з використанням чотирьох повторностей для кожної трансформації генетичної конструкції (плазмідні) з послідовністю EXP або промотором + лідером + послідовністю інтрона. Фонова експресія GUS була визначена з використанням негативного контролю плазмідної конструкції, в якій був відсутній трансген GUS. Середні рівні експресії GUS та люциферази наведені в таблицях 7 (лист) і 8 (корінь). У цих таблицях значення люциферази світляків (наприклад, експресія pMON19437) наведені в стовпчику "FLUC", а значення люциферази ренілі морської (наприклад, експресія pMON63934) наведені в стовпчику "RLUC." Також в таблицях 7 і 8 представлені середні показники GUS / FLUC і GUS / RLUC, які представляють собою міру відносної різниці показників сили експресії в аналізі протопластів.

Таблиця 7

Середні показники GUS, FLUC та RLUC, отримані з трансформованих протопластів листа кукурудзи

Плазмідна конструкція	Промотор Лідер	SEQ ID №:	Середня GUS	Середня FLUC	Середня RLUC	Середня GUS/FLUC	Середня GUS/RLUC
pMON26414 6	P-CI.RCc3:3 L-CI.RCc3:2	1 2	5328064,7 5	105434	253107,5	50,73	21,15
pMON26414 8	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	773613	147918	338149,5	5,23	2,28
pMON26408 8	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	2883555,7 5	129947,5	309268,5	22,33	9,45
pMON26410 7	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	1093785	124864,75	306178,75	8,70	3,55
pMON26418 6	P-MISgr.RCc3_1:1 L-MISgr.RCc3_1:1	9 10	2613839,7 5	128887,25	301412,75	20,45	8,83
pMON26418 7	P-MISgr.RCc3-2:2 L-MISgr.RCc3-2:1	11 12	2370706,2 5	149383,5	370443,75	15,95	6,53
pMON26404 9	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	7506585,7 5	150939,25	368035,5	50,15	20,88

pMON264050	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	4447254,2 5	155356,25	364604,5	28,78	12,40
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1 L-Td.RCc3_3:1	17 18	1100118,7 5	153451	316691,5	7,13	3,48
pMON264166	P-So.RCc3:2 L-So.RCc3:2	19 20	3062045	143684,5	332394,5	21,55	9,45
pMON264108	P-SETit.Rcc3-1:1:10 L-SETit.Rcc3-1:1:2	21 22	147483	129834,25	300917,25	1,15	0,50
pMON264206	P-Os.Rcc3-1:1:24 L-Os.Rcc3-1:1:2	23 24	184905,25	171440,75	386387,25	1,08	0,50

Таблиця 8

Середні показники GUS, FLUC та RLUC, отримані з трансформованих протопластів кореня кукурудзи

Плазмідна конструкція	Промотор Лідер	SEQ ID №:	Середня GUS	Середня FLUC	Середня RLUC	Середня GUS/FLUC	Середня GUS/RLUC
pMON264146	P-Cl.RCc3:3 L-Cl.RCc3:2	1 2	185142,3	18310	34502,5	10,18	5,43
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	16306,5	17008	31233	0,98	0,53
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	101603,8	19201,25	43298	5,23	2,33
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	29196	14483,5	34700,75	2,03	0,88
pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1 L-MISgr.RCc3_1:1	9 10	87232	18411,75	44755,75	4,80	1,95
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2 L-MISgr.RCc3-2:1	11 12	510761,5	19093,75	41948,5	26,98	12,30
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	884517,8	23881,75	55790	37,23	16,18
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	91634,5	18385	43509,5	5,03	2,18
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1 L-Td.RCc3_3:1	17 18	50257,25	18716,75	34489	2,65	1,45
pMON264166	P-So.RCc3:2 L-So.RCc3:2	19 20	508345,3	22335,25	51655,75	22,98	10,13
pMON264108	P-SETit.Rcc3-1:1:10 L-SETit.Rcc3-1:1:2	21 22	8123	17750,75	37872,25	0,45	0,23
pMON264206	P-Os.Rcc3-1:1:24 L-Os.Rcc3-1:1:2	23 24	336095,3	17709,5	40179,5	19,65	8,63

Як показано в таблиці 7, все гомологи RCc3 промотора продемонстрували здатність контролювати експресію трансгена в протопластах листя кукурудзи. Деякі з гомологів RCc3 промотора контролюють експресію краще, ніж інші в цьому тесті, на підставі показників GUS / FLUC і GUS / RLUC. Надалі, як показано в таблиці 8 вище, всі гомологи RCc3 промотора продемонстрували здатність контролювати експресію трансгена в протопластах кореня кукурудзи в різному ступені.

Приклад 6

Аналіз регуляторних елементів, які контролюють GUS у трансгенній кукурудзі.

Рослини кукурудзи були трансформовані векторами, які містять RCc3 промотор, функціонально пов'язаний з його нативним RCc3 лідером, який контролює експресію трансгена β -глюкуронідази (GUS). Отримані трансформовані рослини були проаналізовані експресією GUS білка.

RCc3 промоторні та лідерні послідовності були клоновані в бінарні плазмідні конструкції з використанням способів, відомих в цій області техніки та таких, як описано раніше в Прикладі 2. Отримані бінарні плазмідні конструкції: pMON264146, pMON264148, pMON264088, pMON264107, pMON264186, pMON264187, pMON264049, pMON264050, pMON264147 та pMON264166. Рослини

кукурудзи були стабільно трансформовані рMON264108 та рMON264206. Якісний та кількісний аналіз експресії GUS проводили, як описано в Прикладі 2. Рослини аналізували на V4, V7 та VT стадіях розвитку. На R₁ і R₃ показаний відбір проб. Таблиця 9 показує середні кількісні показники експресії GUS для стабільно трансформованих рослин кукурудзи.

Таблиця 9

Середні кількісні показники експресії GUS для стабільно трансформованих рослин кукурудзи

Плазмідна конструкція	Промотор Лідер	SEQ ID №:	V4 лист	V4 корінь	V7 лист	V7 корінь	VT лист	VT корінь	VT квітка / пильники	R1 качани/маточкові стовпчики	R3 21ДПЗ зародок	R3 21ДПЗ ендосперм
рMON264146	P-Cl.RCc3:3 L-Cl.RCc3:2	1 2	25,15	61,31	20,71	42,64	35,96	95,19	298	125,12	21,97	186,52
рMON264148	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	48,34	36,81	42,49	125,25	69,76	55,44	277,93	58	67,08	115,71
рMON264088	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	28,31	51,18	59,2	149,2	70,93	158,32	214,47	120,72	141,85	164,68
рMON264107	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	67,1	327,44	85,02	365,51	161,65	202,17	787,25	103,63		
рMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1 L-MISgr.RCc3_1:1	9 10	38,66	40,25	39,7	139,98	105,24	308,24	406,38	239,35	118,54	196,48
рMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2 L-MISgr.RCc3-2:1	11 12	25,9	193,25	42,13	291,5	48,02	549,37	87,89	41,83		
рMON264049	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	283,86	238,31								
рMON264050	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	51,82	653,38								
рMON264147	P-Td.RCc3_3:1 L-Td.RCc3_3:1	17 18	42,49	55,87	41,49	197,51	117,77	282,63	1182,96	938,3	815,36	1240,92
рMON264166	P-So.RCc3:2 L-So.RCc3:2	19 20	34,11	215,86	125,91	855,23	79,33	237,25	347,99	177,13		

Як показано в таблиці 9, всі гомологи RCc3 промотора контролювали експресію трансгена GUS в стабільно трансформованих рослинах кукурудзи. Крім того, кожен промотор мав унікальний характер експресії. Наприклад, експресію VT квітка / пильник відрізняли серед гомологів RCc3 промотора. Експресія, яку контролювали P-Td.RCc3_3: 1 (SEQ ID №: 17), була найбільш високою для всіх спостережуваних промоторів, тоді як експресія, яку контролювали P-MISgr.RCc3-2: 2 (SEQ ID №: 11) була найнижчою, відносно експресії R1 качанів/маточкових стовпчиків, P-Td.RCc3_3: 1 (SEQ ID №: 17) показала найвищий рівень експресії в цих тканинах і P-MISgr.RCc3-2: 2 (SEQ ID №: 11) показала найнижчий рівень експресії. Експресія, яку контролювали P-Td.RCc3_3: 1 (SEQ ID №: 17), збільшена в тканинах, які розвиваються пізніше. Рівень експресії збільшувався в корені від стадії V4 до стадії VT та навіть перевищив VT квітки / пильника, R1 качанів / маточкових стовпчиків та R3 21ДПЗ зародка та ендосперму. Експресія, яку контролювали P-Td.RCc3_3: 1, була найвищою серед гомологів RCc3 промотора в VT квітки / пильника, R1 качанів/маточкових стовпчиків та R3 21ДПЗ зародка та ендосперму.

Відносно експресії в листі та корені, деякі з гомологів RCc3 промотора продемонстрували більш високу експресію в корені по відношенню до експресії в листі. Таблиця 10 показує співвідношення експресії в корені до експресії в листі для всіх проаналізованих промоторів RCc3.

Показники співвідношення експресії корінь/лист для стабільно трансформованих рослин кукурудзи

Плазмідна конструкція	Промотор Лідер	SEQ ID №:	Середнє корінь/лист		
			V4	V7	VT
pMON264146	P-CI.RCc3:3 L-CI.RCc3:2	1 2	2,44	2,06	2,65
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	0,76	2,95	0,79
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	1,81	2,52	2,23
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	4,88	4,30	1,25
pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1 L-MISgr.RCc3_1:1	9 10	1,04	3,53	2,93
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2 L-MISgr.RCc3-2:1	11 12	7,46	6,92	11,44
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	0,84		
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	12,61		
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1 L-Td.RCc3_3:1	17 18	1,31	4,76	2,40
pMON264166	P-So.RCc3:2 L-So.RCc3:2	19 20	6,33	6,79	2,99

Як показано в Таблиці 10, кожен гомолог RCc3 промотора продемонстрував різні коефіцієнти експресії кореня до листа та різний її характер від V4 стадії до стадії VT. Наприклад, P-CI.RCc3: 3 (SEQ ID №: 1) підтримує аналогічне співвідношення експресії від V4 стадії до стадії VT з невеликим зниженням, яке відбувається на стадії V7. Як показано в таблиці 9, експресія в корені злегка знизилася від V4 до V7, а потім збільшилася на етапі VT. Промотор P-Ds.RCc3_3: 1 (SEQ ID №: 7) продемонстрував зміну співвідношення експресії від стадії до стадії V4 VT з більш високою експресією в корені по відношенню до листа в стадіях V4 і V7, а потім зсув, який наблизив експресію в листі по відношенню до кореня на стадії VT (1,25). Як показано в таблиці 9, цей промотор демонструє збільшення експресії в листі від стадії V4 до VT, тоді як експресія в корені знижується від стадії V7 до VT. Промотор P-So.RCc3: 2 (SEQ ID №: 19) підтримує співвідношення експресії в корені до експресії в листі на рівні 6,33 на стадії V4 та на рівні 6,79 на стадії V7, але потім знижує до значення 2,99 на стадії VT. Разом з тим, експресія з цим промотором збільшилася в 3,69 і 3,96 рази в листі та корені, відповідно, від стадії V4 до V7, а потім знизилася до 2,33 і 1,10 по відношенню до V4 на стадії VT.

Примітно, що не всі промотори мали вищий коефіцієнт співвідношення кореня до листа. Наприклад, промотори P-Ds.RCc3_1: 1 (SEQ ID №: 3) і P-Td.RCc3_1: 1 (SEQ ID №: 13) мали співвідношення кореня до листа нижче одного на стадії V4. Разом з тим, експресія, яку контролювали P-Td.RCc3_1: 1, була 6,6 рази більше, ніж P-Ds.RCc3_1: 1 в корені на стадії V4. Найвище співвідношення кореня та листа на етапі V4 було досягнуто за допомогою P-Td.RCc3_2: 1 (SEQ ID №: 15). Співвідношення експресії кореня та листа з промотором P-Ds.RCc3_1: 1 збільшилася з V4 (0,76) до V7 (2,95), а потім повернулося до співвідношенню, аналогічному на V4 (0,79).

Промотор P-MISgr.RCc3-2: 2 (SEQ ID №: 11) продемонстрував збільшення експресії як в листі, так і в корені зі стадії V4 до стадії VT, включно. Цей промотор мав співвідношення кореня до листа вище 6,9 протягом усіх трьох стадій, але співвідношення змінилося з 7,46 на стадії V4 до 6,92 на стадії V7, а потім збільшилася до 11,44 на стадії VT. Експресія, яку контролювали P-MISgr.RCc3-2: 2, збільшилася в листі та корені від стадії V4 до стадії VT.

Кожен з гомологів RCc3 промотора продемонстрував патерни експресії в стабільно трансформованій кукурудзі, які не можуть бути передбачені в силу того, що отримані з гомологічних генів, особливо при використанні для трансформації гетерологічних видів, таких як кукурудза. Більшість промоторів продемонстрували більш високу експресію в корені по відношенню до листа в деяких точках або на стадіях V4, V7 або VT, або на всіх етапах аналізу. Слід зазначити, що величина експресії широко відрізнялася між промоторами. Унікальні властивості експресії кожного з гомологів RCc3 промотора роблять деякі з них більш відповідним для певних типів експресії молекули ДНК, яка

транскрибується. Наприклад, експресія молекули ДНК, яка транскрибується, може мати вирішальне значення для засвоєння поживних речовин у ґрунті та яка найкраще експресується в більш пізній стадії розвитку, коли рослина збирається почати розмноження та виробництво насіння, може отримати найбільшу вигоду з таким промотором, як P-MISgr .RCc3-2: 2 (SEQ ID №: 11), який збільшує експресію в корені на стадії VT.

Із ілюстрацій та опису принципів винаходу фахівцям у цій галузі техніки буде очевидно, що форма та деталі цього винаходу можуть бути модифіковані без відступу від цих принципів. Ми заявляємо усі модифікації, які знаходяться в межах сутності та обсягу формули винаходу. Усі публікації та опубліковані патентні документи, цитовані в цьому документі, включені шляхом посилання так, як би кожна окрема публікація або заявка на патент конкретно та індивідуально вказувалась як включена шляхом посилання.

<110> Monsanto Technology LLC

<120> РЕГУЛЯТОРНІ ЕЛЕМЕНТИ РОСЛИН ТА ЇХНЄ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> MONS:331WO

<150> 61/785245

<151> 2013-03-14

<160> 44

<210> 1

<211> 1500

<212> ДНК

<213> Coix lacryma-jobi

<400> 1

gttgacgtcg gaagtgatcc gaatcaaaaca ccaacagggc tagaacgccc ggagagcgag 60
gttcagttc aacctgctga gacagcaggg accctggcta aaccgacgaa aaccgatcta 120
gagaccggt tagatcgatc tagggtttcg ggctcctgtg ttgataactc tagaactcct 180
cccgggaaga cccgtagggg agaagcacgt agaggtgtc ctaggaccag caaggccgccc 240
tagaacgccc tcaagtctcg tcgggagacg cgccgaacag caaggtagaa ggaagaaagg 300
gtaaaagggt agtagattga tttgatcga ttagggtcgg atgcctcaat cggccatgat 360
cctctcatat atatagagg ggctgggtct atcccaatag gaaacatctc cggatacgtat 420
ctccaagctt cctatccgga ctctatcaac atatagaatt caatccggac gtgacaaggt 480
aaccctgatt tcgcccgtcc ttggatcgac cagatcggtc taatgggctt tatcagccca 540
tactgatcaa caaatcgctc ttacaagaga aggatccaca tacttagcgt cggactcagc 600
aatcatcaca accataaggc ctccaaccag ggccacctgg tcggacataa catgagtgat 660
cggaaaccca aatgatcag gcccatcaca cttagaacat ctgatctctc aaaagacaaa 720
ttcgacctta atattacagg ccgaataact ctctaaatt cattttatc tgtgacactt 780
ttgagtgtca acagtatgct tttcttgca aatattccct tttttattc tacccattag 840
ttactttggc cttccattt cattgtatgt aaaagtggat actaaagcta acgcaacaag 900
aacaataata aatagatccg gggtagacg tccccacgga tattttacta aaatatcttc 960
tcacagatc tagaaaatcc tcgggccta tccatatagg gtgtatcac atccatatac 1020
ttatagtagg acagatgagg agatttttt accctcaatt ctaaaattca tcacttaat 1080
taaagggaatt taactcagga ccagagcggg gtcgagagag ccatatatgt aacaaaaata 1140
cctattagt tagggcagca gcaataaac cattattcct ttgtccctt atccgtctc 1200
cagctagcta aaagtgtac atatgattaa tcacgacat cgtgcatgca atttcagga 1260
aagtgaagg agcagccagg tgtatacag tctgtagggt tcgctgaca tcgatcacat 1320
ggatatgcat gcatccaaa cacacgtacg tacacttgct ggtgcatgcc ttatgaaatg 1380
gaatactaca cgcgtgtcca caagtaagc acgcacaggc acacacacag agagacacag 1440
ttgctcgctc aatgcaattg gctggtctat aaataaccacc gaagagaacc atcctaaga 1500

<210> 2

<211> 86

<212> ДНК

<213> Coix lacryma-jobi

<400> 2

acacaccggg agcgattcga tccttcagaa gagctactgc tagctagcta gagctatcat 60
ctgatcggta gcagcaatat aattca 86

<210> 3

<211> 594

<212> ДНК

<213> Digitaria sanguinalis (L.) Scop.

<400> 3

accaacaagc atcatgacaa tggcagcaaa gcattcgtca gagacgacca acaagcatca 60

cgacactggc ggcaaagcat atcaaaacaa tgtaatgaga tacaatattg ttccataaag 120
aagcctacct gcatgatcct ttctaacaaa ctcaaaatga taagggccat gctctgttcg 180
gtgacaacct tcaaggcatc tactttgccca gaatttagct ttgttattac cagcttgta 240
ttagtctta ctatccagtc tcgaacaact tgggcgcctt ttgtctcacc ataccctac 300
atactgccct ccttgatcaa cacaacattc ttaacccaa tcccttggca ttgcgcgcatg 360
ttacaagggtg aaaaacagcc agcccatatt gcaagttact aaactaaact atggtccaaa 420
tgcagcaatc ttgatcgcta gtagtgcg gcatatatc tgaacaagt ccagatcacc 480
catctcatca cagtcacatg cattgcggtt cacggaaacc gtaaacacac caccaactag 540
tcagcattgc accaatcttc ctccataa atgcagcaac aatcgagcga cacc 594

<210> 4

<211> 88

<212> ДНК

<213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

<400> 4

aacaccacga accatcacag gcacttatag caacaatcaa gttatttctg cttgtgcac 60
tcgtggtcga gtagtaatac atagcaaa 88

<210> 5

<211> 1500

<212> ДНК

<213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

<400> 5

ttgccggcct gtgtgatgtt ggcggccac caaccttga tttgctgc tgcctgtca 60
gccaacgggt gtagtccac cctctcaaa cgtcgcaccg aagtctgtc gactccaga 120
gaaaatattg tatgaacat atactattac tactacagct gaacacgtaa caatgatc 180
ttatttgtgt atgccgaaag caccgtgcta aagaccacct atgcgcctgg ttgggatcga 240
ggcctgtctg ctacgccggt tgcacagac gtgtcgtgc atcgcgatgac tggcatgtga 300
gtgtggttc ataaataatg tctaacaata ttaaggtaat tcctagtatg cgttgggatc 360
atttttgat gttggatctt gcggcaggtc tcacccatgc atgacggatt gagaacaagg 420
gagactggac cagcatgtaa aagataatga tgaaggcgag ccatgttgac ggtgtaccgg 480
gacaggcaga cgcggggcaa catcgaagag ggagatagcg tgcgtgctaa tgttttgtg 540
gctcgcattg tcaatgactc atacagattt cggtagcttg ctaaaatcat tcagctgtgc 600
ggcaagcatg ggccaaacaa tctagcaaca atccatgtt gccatcgatg caataggaag 660
taatagaatc cacttagctt ctatgctca cctggatcct ccttttattt atatgcata 720
attttgtgtt agtggaggca cacatcttta tgttcatgg ataataattt gttatatga 780
tatctgtcca aataaataac gtacgtgtcc ttcaatctta gactccagtt agattgatca 840
atgtagtggt ctccatatt ccttttgtgt ttgtgtgcc atgtctcaag catgcatgtg 900
gaatgaaaag ctggaagctt ggcataaatt gcctaaggag ccataccata aattaaacca 960
tttgctgata tggccacaat tttttaaca agctatgcca tagtcattca tgtgccacgg 1020
ttgtgaatc gcctcaatta cgtgtggaac atgatgtgtt ttaaacacac acttgggtgat 1080
ttctattctg gcctactctt gcatctagga tcgtgtgtt agccatgtgc acatatttag 1140
ctagctagta gcaaaggcat gtagtgattg ctgatgggtt tacaataacc agcataagta 1200
tcattaatt tgaagtgaag caggttcatt aacatatgag aaaacttaca ttataattg 1260
cttgggtcaga tgaaaaccta gctgattcct tggcgacgac aacatccctc cttgttccat 1320
actttcttaa taattatttt tctcccaaaa agtccatcgc gctagcatca atgaagaaat 1380
ataagaaaaa tctcatatc cacatagtaa atagagcatt atgcggtcca ttaggaatc 1440
acctggggag cacctgcttg ctcaatcaca ctataatac caccatata ctgctcaag 1500

<210> 6

<211> 104

<212> ДНК

<213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

<400> 6

agaaccatca cagacatacg ctacacgcac cctgtacgaa caaccaacct agctagctac 60
ctactgaaaa cacacataag cttgctaggc agcatatcat agca 104

<210> 7

<211> 1407

<212> ДНК

<213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

<400> 7

atctcaaga tgcgtgaatc gatttctga gtcaaatatt ttgtttcat attatttagg 60
gagttttca tatggacaat acataaaaa atatatgcag tgcaagttat tttgtttac 120
ttattcaatt tatccgttca atcccctaaa caaaatttta ccctaaacta tttatttgg 180
tccaatctac accctaatta tatttctctt tttattctc tgtgtctgag ttaaatttg 240

acttcaaatt ttatgaatag atgcaaaaca tgatgcttta tgctaaaaat ttctactaag 300
aaattttctt ttttatgttc ataggtaag aatattta atgaaattga tcttacatat 360
ataaaactgt acaaaaagta atcatgaaa aaattaatat attgttcta acatagagca 420
ttatgtataa gtcaactgac aaaattgaa attaaaactc agcttgcatg tgaagaaaca 480
aaaaaagaga aatctaatta ggggttagatt ggaccaaata aaatagtta aggggggta 540
aaatgagcca aattttgttc aaggggttaa gtggatcaag taaatagatg aggggggtaa 600
aatggacttt ttcaacaat taacctcatc tatagaagg taggtgcatc tcagtcgaa 660
aaataagatg catttggatc ttgaaaaatc aatttccct cacacccca aatggaaatt 720
gtcgtcacta ctcagataac taatgaaagt agactcttat tgtgatgac caaaaggct 780
ctgtgattgg aatttcgtcc acactatttt cacaacatcg taatgagata taatattgt 840
ccaccagaaa gctacatcg atggatcatt ctaataacca actcaaaaaa tggtaaatga 900
catgctcttt tagtgaaaaa cttaaggaa cctagctgc caaaatttat cttgtcatt 960
aacaactcag ttcaacat ccagctcaca acaactcac tttttttt gcgggtaaaa 1020
caactcact ttacatggg ccaaatgaa cacaacagtc acgtccatt gaggtaccta 1080
gcaactggg catccttgt cctgacctc tacatatttt tgcctctgat caacacaaca 1140
ttctaaacc catttcttg gcattgccc atgtacaag gcgcaaaaca accaaccat 1200
atggcaattt actaaactaa actatgctga tccaatgcag caatctgat cgctagtact 1260
gtccagcatt acatctgaaa caagtcaga taccatct catcacagtc acatgcatcc 1320
atggcacgg gaaccgtta cacacaccac caactaatcg gcattgtcc aatcctcta 1380
taaatacagc aacgatcagg cgagaca 1407

<210> 8

<211> 90

<212> ДНК

<213> *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.

<400> 8

ataccaatc acacacagtg ttagcactta gcaaccgagg tatttctgcg agctttgtgc 60

ccttctgtg gtcgagtaat tagtagcaa 90

<210> 9

<211> 583

<212> ДНК

<213> *Miscanthus sinensis* f. *gracillimus*

<400> 9

tctgctagat gcaacgagct ggaagccagg cctgggacaa ctcgttgatg ggcgtgggg 60

tcatcaaca gagattagct tatccattt tatgtatg tgccatgtat gcatatgtt 120

tggaataatg gtgactcgtg aggaagcccg tgcacatgtt ttggaatgat ttctgccacc 180

gatcgagaa ttcaaaataa ggagagcaca tcagtgttc gttaaataa taaacggtag 240

attgaaataa tgattccagc tagcactata tattgtatt ctacgttaa aattttatat 300

attgcataag ggtcctcta attcatgcat cactagtagc tagcacgttg agtgtattg 360

gcatgttct tcaactgct tcccgtgat cctgatgat ctctcctca taactggcac 420

atcccaggac aaccaggcaa cgctcaaatc acacatcggt tgcgtattat ccacgctgca 480

tgatgcacga agccaatcac taaagcatca cttccacac catcgttcag ctataaaac 540

cctgccaac tgcgtgagag gaccatcca aagcacaaga gca 583

<210> 10

<211> 61

<212> ДНК

<213> *Miscanthus sinensis* f. *gracillimus*

<400> 10

cgaagtgcag cactaaagca ccacttctg ctacaccgt ttagtaata atccatcacc 60

a 61

<210> 11

<211> 1500

<212> ДНК

<213> *Miscanthus sinensis* f. *gracillimus*

<400> 11

ttgtgagaca aaaacactgt tgcggctggg aataagccgg ctgataagt caagcgaaca 60

ggctgtactt tagtgctct atttgaacca ttggttctca ctctggctat gcattgtgc 120

attctactc tggctataa ttttcttg ctagtaata gttttgaaa taatgggagc 180

aaccattca gttataatat aatgttga ttgtataat ggagcaatca ctctggtta 240

ttgtgcctg ttataccat gcaggctgca ttatattaat tgcttagtct cttctgtt 300

gtatgtgact atgagattt tgtgacctc acaggaagt aaggaagag gattcctgct 360

ggttcaaca gacatagca gaaaggggt tgcctctg attgtgtatc tagatcacag 420

tagtgtaat gtgcaccaag caaaactaa attaggtgct ctatccatgt acattaagcc 480

tagctgtatc aaaaaaaatt cgggtttatc tgcgtaatat tggatgtata tataagattc 540
tggcattgga atttatattt ttttttgtt tttaattcat tatcacagac gcgtgttgg 600
cgtgcgcgtc tgtcataagg tgcgtcaca gacgcgttt gactatacgc gtctgtgata 660
gggttactac agacgcgtct ttactccacc agtctgtctt ataacctaat cgcagacgcg 720
tgtttgata acgcagacgc ttattggtaa cacgcgtctg tagaagaaac ttattacaga 780
cacgttatta agcgcgtctg tgatgtctt taacacgcgt ctgtaatgtg gatttattac 840
atagtgtatc gcccatatga acgaatgatc gatctaggcc caaagttagt gtatgaaatg 900
ttcatttacc ttcaatgcg gtttctcaaa aaaaaacgtt ccaatgctaa aaaaaaacat 960
aggaattata tagttttgct gtggcttagt aacttcgtcc aatcgtgcta gtttaattg 1020
tatatactg taccatgcta ttctctggc cttggttct gcgcatccat tattaatgac 1080
cacgccacgc cagcattca ttctaatca ccagttgctt gacatccaat gtcctctcca 1140
ctacttgcgc acaccgtctg atactccaag atcccaagct aagataacac ccagtgatca 1200
tatatataaa aacaaacgcc agtgcgagcc tggccattg cggagccaac cgaagccgtg 1260
cacaaaatat tcgataccgt atcagggaaa aactagtta tacgaggtag gcaataatcc 1320
atgtttcaaa aaaaacaggt aggaataat ccagatcgga ctcttctaa ccgggttcac 1380
atgcatatat gaatatgatg gccgggttca catgaacgt agatatcgtg cctagtagtg 1440
caccgattt ttaatcccga ggctggacta taagtacccc tggtaacacc gtgatcaaag 1500

<210> 12

<211> 98

<212> ДНК

<213> Miscanthus sinensis f. gracillimus

<400> 12

catcgcaaac aagctgctaa tcacttctca agagctctct aactacatta attagctaga 60

gtgatccgcg aggtagctgg cttgtgatcg agcaatac 98

<210> 13

<211> 740

<212> ДНК

<213> Tripsacum dactyloides

<400> 13

aaatggatga aacaactgg accaatcaga gatggccacg tcagctcccg atcgtcgtaa 60

ccgaccaaac ccgatcgata acggtttagg ctccaatata ccgtcggtag caccgggtcg 120

ctatcatctg cccccgtccc aacgctattg gtatcgtcgg cccctatac ggctggtagc 180

ccagtcacc gtcggggcca atcgcccct gtcgctccg ctctgtcgg taccgatcg 240

caaaaacgcc acgtcaacgg cactgcggta ccgaccgcc ctggcaccgg ccttagcggg 300

ccacacgacc gatcgctgtt gtacggacgt agaggtgaat catgcgattg aatttcgct 360

agaggaaagt tatcatctta ttactccaa cctctctcc tacggctgga tccgacgaaa 420

atttacctg gacggtgcca gtaacaattg caggtctcac tcacgtgcta aatccagcaa 480

tcaaacacga aggaatatac gtgatctggc cagaacatgc aagagaataa tacagtagtg 540

ttagagtacg aaacctacac gattcaacga attaatcaat ggggtcacgt tcacgggtat 600

gtcgcgcac gtccaaaatc caacgacatt ttataagcg gcatgatcca gacggggccag 660

ctcagacacc acatggcgtg gtccatctc gcatcccca tcaccgctat aaataccatt 720

ggccatgcac acccgactc 740

<210> 14

<211> 91

<212> ДНК

<213> Tripsacum dactyloides

<400> 14

ccacacagca caagcagcag cagcagcagc agctcgatcg aactagctta gctactacgt 60

gcgcgtgcaa caagcagctc gatcgatcg c 91

<210> 15

<211> 903

<212> ДНК

<213> Tripsacum dactyloides

<400> 15

actataatt tcatagagac catttctccc tccataccat ttaaaaaatt caaacaacaaa 60

atatctataa gtggccctag gttaagaaaa gtgccagtgg aaatgcatct ttattgacgg 120

ttttctgta tctattgcca gtaaaaatca tatatttaca ttggcgattc ttgaagcat 180

accgtcatga caaatctgat ttctattgac agaattgctta agagaatcgc tattggtcat 240

ttagttgcag catttaattg gtatgttagt ctatgaaata gggaagtgga attttgtatt 300

gagagatatt gtttcttct tagttttacg acaccttga tgatgtagca gcgctggaaa 360

gagtgttatg aaattcctat tgagaatagc cttacaggtc aacagcatac ttttaaaatt 420

aaaccagaga tataccaaac ttcagttct acgatataat attttctac ctcataagtt 480

ataatcagtg gtacctcctt tttttatat ccccttatta aggacggtag agaacgtcct 540
 ctactcgtat gttgtacacc accggtaacg caattaagta aaacatgcat gtcaagtagt 600
 aagtatataa gttggcaact caccagatgg caggagtcct gacccatcac cggctagcta 660
 tagctcttgt tacgtgaatt cagcatgatt gctcaacttg cttctgtatt tccacatggg 720
 ggagaattgt catactccc cctaacaact ggcgcgtcca gagacaacca tgcaatgacc 780
 aaaccgatcg aatcacacat gctttgcagc attcatgtac caatgctgcc aagcacgaaa 840
 gcatctccct ctccgctcca tccatcgta gctataaaaa ccatgccaaag caccctgtga 900
 aaa 903
 <210> 16
 <211> 69
 <212> ДНК
 <213> *Tripsacum dactyloides*
 <400> 16
 gcatcccaaa gcacacaaga gcacgcagtg cagcactcaa gcacttctg ctactgcac 60
 accgtacca 69
 <210> 17
 <211> 1500
 <212> ДНК
 <213> *Tripsacum dactyloides*
 <400> 17
 aaaaggcact ttttcaaga aacagagtta gagatcaaac caaagtgcta gaaacattgt 60
 aataggtagt tgcaacatat taaagggtc aaacctcaca gttttaccct tttcacaaa 120
 gttgcacttc ctggcctcgt ttaagcttat ttggacttag aatcttcaaa ttgtgctcga 180
 ttgaaccttt actcatatac ttagcaaaac agttagtcca agatgtgtg ttggacattc 240
 aatcaccaaa acttatggaa atggcttaat tgcccatttc ctttcatgg tacaattgt 300
 ttcacagatt taagcagaag ctatatcaaa cacggcgctt ctacaacagc ttatcagttt 360
 agttgcttct cagaatgaaa ggtaataaac ataagctgct tttactaga tccttagata 420
 agttgctttt ttaacaagca gctctgcca gcagggccat agtgccatgt tgtaggctgg 480
 tcgctttccc gagccatatg aaggtcgtcg gtccatgtgg ctgaaattaa agttgatagg 540
 cccatcgga ccaatggtca attagaggcc caaaattgt gagtcaaatt ttcattaca 600
 ctccacgct agtaaagca aacatatata gtacctatat atcgatttt ttttctggt 660
 gtcttagaaa ctctgcca taatcatgct agtttaatt gtatactgc acaaagctat 720
 tcctctggcc ttggtcttt gcgcgtccat gctgtttat ggatgattgc agccacgcca 780
 cgcattcatt ctcaatcacc atttgcttga catctaatt cctctgcacc acttgcgcac 840
 gctacacacc gtctgatacg ccaggatccc aagctaaaat aacaccaat gatcatgtga 900
 aaacaagtga cagtgcgagc cagcccatgc agcgatctg gccatttgcg gagccaaccg 960
 aagccgtgca caaaatattc gataccgat aaggggaaac actagtata cgaggtaggc 1020
 aaatataatc ctcttctaa ccggcgcccg ggtcacatg catatatgat ggccgccagc 1080
 cgggttcaca tgatgaacgc tatgtgcct agtcacgat ttattaatct cccgaggctg 1140
 tactataaat acatcggtaa tactgtgatc aaagcatcgc aaagaagatc tctaagactg 1200
 tctccagcaa cgctctctat atctatctc tatatctgc cttacagtc tcctctaaaa 1260
 gattccatcc tctatatctc ctctctcc aacaacggcc tctaaatcac gtcctctata 1320
 cgcaaatacc tatattagag acatttttaa tttttaatt ttgtacata cgtatttgc 1380
 atactctcaa atgtattgta catatttag tttgctaaa ccggtgttt aaagtattca 1440
 aatggataga ggagaggaga gagaaactct atatatagag gatccagcag cgtcctctaa 1500
 <210> 18
 <211> 172
 <212> ДНК
 <213> *Tripsacum dactyloides*
 <400> 18
 atttagagga ccgttagag gacgctgctg gagggagtag aggacgacag cgttctctaa 60
 aatttagagt acaggatact ttagaggacc tgctggaggc agtctaaca ctgcatttg 120
 ctagagagag tgatcgcgag gtagctagct ggctgtgat cgaatcgagca aa 172
 <210> 19
 <211> 645
 <212> ДНК
 <213> *Saccharum officinarum*
 <400> 19
 caaattaaag ttgataggcc catcggaaga aatgatcaat gtaaggccca aaattgtgt 60
 ctgaaatgtt cgtttacatt ttaagctaa ataaaaacat aggaattata tagttttgct 120
 ggtggcttag aaactcgtc caaaatatta aaaaaaaga aaagaaactt cgtccaaaat 180
 ggtgcttagt ttaattgta tacctgcacc atgctattcc tctggcctg ttctttgctg 240

catctatcca tgcctatgga tgatcgagc cagccacgc aattcattct taatcaccat 300
ttgcttgaca tccaatgtcc tctacaccac cacttgcgca ccctacacac cggccatttg 360
atacgccaag atcccaagct gaaataacac ccaatgatca tatgaaaaca agcgtgagtg 420
cgagcctgcc catgcagcga tcttgccat ttgcgagcc aaccgaagcc cgtgcacaaa 480
atattcgaga ccgtataagg gaaaacacta gttatagca atgtccacaa taatccagat 540
cgactctcc taaccgggtt cacatgaacg ctgtgtgcc tagtgaccg atttctaaa 600
tcccaaggct cgactataaa taccctgtgt atttgaccg tgatc 645

<210> 20

<211> 86

<212> ДНК

<213> Saccharum officinarum

<400> 20

aaagcatcgc aaacaagcta aagagctctc taactacatt gattagagtg atctgcgcta 60
gaaggaggct agcttgat cgagca 86

<210> 21

<211> 1563

<212> ДНК

<213> Setaria italica

<400> 21

agaccagca acctaccgag ggggtacccg aggtagtgt ttgtgggtgg gctcgtcgaa 60
gatcaggaaac ttgaaggatg actgaacac acgatttaga caagtcggg ctgcttatgc 120
cgcataatac cccatgtcat gtgtgtgtgt tggattgtat tgattgatca gatatttga 180
ggggggccctg cctcgcccta tattgcccat tgcgggagcc agggctacag gtcggtgtt 240
gtacaagagt actagtcgt ttgaccagc gactctact ctaattgcta caagtagtt 300
cctaactctt gactagtctt tgccgccac gtgaccacg acgtcttga cctagtctct 360
gtgttgata catcttggt tacagtccga tatttagga ctatccaagc ttccagtag 420
gcccatagat gtatggccga caactggata atgtaactct gggcagtag tatcctatc 480
tatatagaca caaacaacgt actatagcag aagttaagc tcgtaacca ccaatattg 540
gtggcataga ccacgtattg ctgatatagt gctcgtacc caccaatatt tegtggcata 600
gagatctctt aggcataaaa ttgacgtac gaaacaatct atgtccacgt gttgctaata 660
caatgttcta aaccttacag cctactggac agttctctag ccatgatata tgtgcatgtc 720
cgaacaaata ttatgggta ccgaaagggt taatttttg tagtattat gagggggagg 780
ggggcggtga cgaaaaaaat aacttagcta agcgttaattg gcttaaaaac atacaatgtt 840
gttccagcat caagcctacg tgatcattc acaaaaccaa ctcaaaagat aggtgtcatg 900
ttccttttag tgcaaaactt aaggacacct acctgcaaa acttagcttt gttaccaga 960
atgaaccgct aagctcgagg agctctgaac ttacatgacc aaatatatta aacacaaaag 1020
tcatgcatga tttctttaa taagtatcga gcaatatgtt tcgggtgtct ttcgtctcat 1080
acctctattg tctccgtga tcaacaaggg tggatccggg tggtgcaagg gggctcaagc 1140
ccccctacct ctcccaaagg agaaagaagg gagaagaaag tgaaggaaga agaaaccccc 1200
tatattctaa tgctacctcc gccactgtg atcaacacaa cattctaaa accatttct 1260
tggcatttgc gcatgttaca aggtacaaaa gagccagccc atatgccaag ttactaaact 1320
aaactatgat ccaccatgga gcgagaacaa acgtcaacag gcatcaacca atgcagcaat 1380
cttgatcgct agtactgtcc ggcattatat ctgaaacaaa tccagatcac ccatctcatc 1440
acagtacat gcattcatgg tcacgggaac cgtagcaaaa ccaccaacta atcagcattg 1500
caacactctt cctctataa atgcagcgag cgggggacac cataaaccat cacaggcact 1560

tag 1563

<210> 22

<211> 67

<212> ДНК

<213> Setaria italica

<400> 22

cgatcaagtt aattttgtt ctgcttgtg cgctgtgtt ccagtaatta cttccgtgt 60
agcaaaa 67

<210> 23

<211> 1528

<212> ДНК

<213> Oryza sativa

<400> 23

ggaagctaac tagtcacggc gaatacatga cgacatcggc ctacaacgca caactcttg 60
gcataaaagc ttaatttca atgccctat ctggaagccc taggcggcgc gcaaatgtaa 120
aacattcgct tcgttgggt tttatcaa aatagagtat ggacctcga cagattggca 180
accgtgggt aatcgaaaat ggctccatct gccctttgt cgaaggaatc aggaaacggc 240

cctcacctcc tggcggagtg tagatatgtg aaagaatcta ggcgacact gcagactgga 300
caacatgtga acaaataaga ccaacgttat ggcaacaagc ctgcagccta ctcaagtgg 360
gggaggccac cgcattgtcc aacgaagcgc caaagaaagc ctgcagact ctaatgctat 420
tagtcgccta ggatatttg aatgaaagga accgcagagt ttctcagcac caagagcttc 480
cgggtggctag tctgatagcc aaaattaagg aggatgccaa aacatgggtc ttggcgggcg 540
cgaaacacct tgataggtgg ctacctttt aacatgttcg ggccaaaggc cttgagacgg 600
taaagttttc tattgcgct tgcgcatgta caattttt cctctattca atgaaattgg 660
tggctcactg gttcattaaa aaaaaaagaa tctagcctgt tcgggaagaa gaggatttta 720
ttcgtgagag agagagagag agagagagag agagggagag agaaggagga ggaggatttt 780
caggcttcgc attgcccaac ctctgcttct gttggcccaa gaagaatccc aggcgcccac 840
gggctggcag ttaccacgg acctacctag cctaccttag ctatctaagc gggccgacct 900
agtagctacg tgcctagtgt agattaaagt tggcgggcca gcaggaagcc acgctgcaat 960
ggcatcttc cctgtccttc gcgtacgtga aaacaaccc aggttaagctt agaattctct 1020
tgcccgttg actgggacac ccaccaatcc caccatgccc cgatattcct ccggtctcgg 1080
ttcatgtgat gtctctctt gtgtgatcac ggagcaagca ttctaaacg gcaaaagaaa 1140
atcaccaact tgctcacgca gtcacgtgc accgcgcgaa gcgacgccc ataggccaag 1200
atcgcgagat aaaataacaa ccaatgatca taaggaaaca agcccgcgat gtgtcgtgtg 1260
cagcaatctt ggtcatttg gggatcgagt gcttcacggc taaccaaata ttcggccgat 1320
gattaacac attatcagcg tagatgtacg tacgattgt taattaatct acgagccttg 1380
ctagggcagg tgttctgcca gccaatccag atcgccctcg tatgcacgct cacatgatgg 1440
cagggcaggg ttcacatgag ctctaacggg cgattaatta atccgggggc tcgactataa 1500
atactccct aatcccatga tcaaaacc 1528

<210> 24

<211> 99

<212> ДНК

<213> Oryza sativa

<400> 24

atctcaagca gcctaatcat ctccagctga tcaagagctc ttaattagct agctagtgat 60

tagctgcgct tgtgatcgat cgatctcggg tacgtagca 99

<210> 25

<211> 27

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(27)

<223> Праймер ампліфікації RCc3_Inter_1.

<400> 25

cagcacgttg gcgcacacgc ccagctt 27

<210> 26

<211> 27

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(27)

<223> Праймер ампліфікації RCc3_Outer_1.

<400> 26

gcacaccgcs gcctcsaggt cgacgag 27

<210> 27

<211> 27

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(27)

<223> Праймер ампліфікації RCc3_Inter_2.

<400> 27

aggttgatgc cgagsatgtt gsccttg 27

<210> 28

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(28)
<223> Праймер ампліфікації RCc3_Outer_2.
<400> 28
cttgccgcag trgttgagga kgaggctg 28
<210> 29
<211> 2001
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2001)
<223> Кодон-модифікована послідовність GUS з інтроном, який вирізається
<400> 29

atggtgaggc ccgttgagac cccgactagg gagatcaaga agctggacgg cctctgggcc 60
ttctccctcg accgtgagaa ctgcggcatc gaccagcgct ggtgggagtc cgccctccag 120
gagtctaggg ccacgcgct gccgggttc ttcaacgacc agttcgccga cgccgacatc 180
cgcaactacg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaggtgt tcacccgaa gggctgggcg 240
ggccagcgca tcgtgctccg ctgcagccg gtgaccact acggcaaggt ctgggtgaac 300
aatcaggagg taagtctctg ctctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta 360
gtagtaatat aatatttcaa atatttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 420
gctttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca 480
aaattgttg atgtgcaggt gatggagcac cagggcggtt acacccggt cgaggccgac 540
gtgacgccgt acgtgatcgc cgggaagtcc gtccgcatca ccgtctcgt gaacaatgag 600
ctgaactggc agaccatccc gcctggcatg gtcacaccg acgagaacgg caagaagaag 660
cagtctact tccacgactt ctcaactac gctggcatcc accgctccgt gatgctctac 720
accactccca acactgggt ggacgacatc accgtgttca cccacgtggc ccaggactgc 780
aaccacgctt ccgtggactg gcaagtcgtt gccaacggcg acgtcagcgt cgagctgcgc 840
gacgccgacc agcaagtcgt tgccaccggc cagggcacca gcggcaccct ccaagtcgtc 900
aaccctcacc tctggcagcc tggcgagggc tacctctacg agctgtcgt caccgccaag 960
agccagactg agtgcgacat ctaccctctc cgcgtcggca tcaggagcgt cgctgtcaag 1020
ggcgagcagt tctcatcaa ccacaagcct ttctacttca ctggtttcgg ccgccacgag 1080
gacgtgacc tgaggggcaa gggtttcgac aacgtctga tggccacga ccacgtctg 1140
atggactgga tcggtgcaa cagctacagg accagtcact acccgtacgc tgaggagatg 1200
ctggactggg ctgacgagca cggatcgtc gtgatcgacg agactgctgc ggtcggttc 1260
aacctgtctc tgggcattgg ttccagggt ggaacaagc cgaaggagct gtactctgag 1320
gaagctgtca acggcgagac tcagcaagct catctccagg cgattaagga gctgattgcc 1380
agggacaaga accatccgtc tgcgtgatg tggctattg cgaatgagcc ggacaccaga 1440
ccgcaagggg cgcgtgaata ctgcgcggc ctggcggagg cgactcgaa actggaccca 1500
acccgtcaa tcacgtcgt caatgtcatg ttctgcgacg cccatacggg tacgatctcg 1560
gacctgttcg atgttcttg tctcaatcgg tactatgggt ggtatgttca gagcggggat 1620
cttgagacgg cggagaaggt tcttgaagaa gaactcctgg cgtggcaaga gaagctccat 1680
cagccgatca ttatcacgga gtacggggtt gacacacttg cgggccttca cagtgttac 1740
acagatatgt ggtcggagga ataccagtgt gcatggttg atatgtacca tcgtgtctc 1800
gaccgggtt cagcgggtgt cggcgaacaa gtctggaact tcgcagactt cgccacgagc 1860
caagggatac tgcgggtagg agggacaag aagggaatct tcacacggga tcggaagccc 1920
aagtcagcag ccttctgtt gcagaagcga tggacaggaa tgaacttcgg agaaaagcca 1980
cagcaaggcg gaaagcagt a 2001

<210> 30
<211> 1812
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1812)
<223> Кодон-модифікована послідовність GUS.
<400> 30

atggtgaggc ccgttgagac cccgactagg gagatcaaga agctggacgg cctctgggcc 60
ttctccctcg accgtgagaa ctgcggcatc gaccagcgct ggtgggagtc cgccctccag 120
gagtctaggg ccacgcgct gccgggttc ttcaacgacc agttcgccga cgccgacatc 180

cgcaactacg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaggtgt tcatcccgaa gggctgggcg 240
ggccagcgca tcgtgctccg cttcgacgcc gtgaccact acggcaaggt ctgggtgaac 300
aatcaggagg tgatggagca ccaggggcgt tacaccccg tggaggccga cgtgacgccg 360
tacgtgatcg ccgggaagtc cgtccgcac accgtctcg tgaacaatga gctgaactgg 420
cagaccatcc cgctggcat ggatcacacc gacgagaacg gcaagaagaa gcagtctac 480
ttcacgact tcttaacta cgtggcatc caccgtccg tgatgtcta caccactcc 540
aacacctggg tggacgacat caccgtggc accacgtgg ccaggactg caaccacgcc 600
tccgtggact ggcaagtcgt tgccaacggc gacgtcagcg tcgagctcg cgacgccgac 660
cagcaagtcg ttgccaccgg ccaggggcacc agcggcacc tccaagtcgt caaccctcac 720
ctctggcagc ctggcgaggg ctacctac gagctgtcg tcaccgcaa gagccagact 780
gagtgcgaca tctacctct ccgctcggc atcaggagcg tcgtgtcaa gggcgagcag 840
ttctcatca accacaagcc ttctacttc actggttcg gccgccacga ggacgtgac 900
ctgaggggca aggtttcga caacgtctg atgtccacg accacgtct gatggactgg 960
atcgttgcca acagctacg gaccagtcac taccgtacg ctgaggagat gctggactgg 1020
gctgacgagc acggtatcg cgtgatcgc gagactgtg cgtcggtt caacctgtct 1080
ctgggcattg gttcggaggc tgggaacaag ccgaaggagc tgtacttga ggaagctgc 1140
aacggcgaga ctacgaagc tcatccag gcgattaagg agctgattgc cagggacaag 1200
aaccatccgt ctgtctgat gtggtctat gcgaatgagc cggacaccag accgcaagg 1260
gcgcgtgaat acttcgccc gctggcgag gcgactcga aactggacc aaccgtcca 1320
atcacgtcg tcaatgtcat gttctcgac gccatacgg atacgatct ggacctgtc 1380
gatgtttt gtctaatcg gtactatgg tggatgttc agagcgggga tctgagacg 1440
gcggagaagg ttctgagaa ggaactctg cgtggcaag agaagctcca tcagccgac 1500
attatcacgg agtacgggt tgacacact gcgggccttc acagtatga cacagatag 1560
tggtcggagg aataccagtg tgcattgtg gatatgtacc atcgtgtt cgaccgggt 1620
tcagcgttg tcgggaaca agtctggaac ttcgagact tcgccagag ccaagggata 1680
ctgcggtag gagggaaca gaagggaatc ttcacacgg atcggaagcc caagtcagca 1740
gcctctctg tcgagaagc atggacagga atgaactcg gagaaaagcc acagcaaggc 1800
ggaaagcagt ga 1812

<210> 31

<211> 1812

<212> ДНК

<213> Escherichia coli

<400> 31

atggtccgtc ctgtagaac cccaacccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60
ttcagtcgg atcgcaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttaca 120
gaaagccggg caattgtgt gccaggcagt ttaacgatc agttcgccga tgcagatatt 180
cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240
ggccagcgta tcgtgctcg ttcatgacg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300
aatcagggaag tgatggagca tcaggggcgc tatacgccat tgaagccga tgcacgccg 360
tatgttattg ccgggaaaag tgatcgtat accgtttgtg tgaacaacga actgaactgg 420
cagactatcc cgccgggaat ggtgattacc gacgaaaacg gcaagaaaaa gcagtctac 480
ttcatgatt tcttaacta tgccggaatc catcgacg cgtaagtcta caccacgccg 540
aacacctggg tggacgatat caccgtgtg acgcatgtcg cgcaagactg taaccacgcg 600
tctgttact ggcaggtgtt ggcaatggt gatgtcagcg ttgaactcg tgatcggtat 660
caacaggttg ttcaactgg acaaggcact agcgggactt tgcaagtgtt gaatccgcac 720
ctctggcaac cgggtgaagg ttatcttat gaactgtcg tcacagcaa aagccagaca 780
gagtgatga tctaccgct tcgctcggc atccggtcag tggcagtga gggcgaacag 840
ttctgatta accacaaacc gttctatt actggcttg gtcgtcatga agatcggac 900
ttcgtggca aaggattcga taactgtcg atgtgcacg accacgcatt aatggactgg 960
attggggcca actcctaccg tacctcgcac tacccttac ctgaagagat gctcactgg 1020
gcagatgaac atggcatcgt ggtgattgat gaaactgtg ctgtcggctt taacctctc 1080
ttaggcattg gttcgaagc gggcaacaag ccgaaagaac tttacagcga agaggcagtc 1140
aacggggaaa ctacgaagc gcacttacg gcgattaaag agctgatagc gcgtgacaaa 1200
aaccaccaa gcgtggtgat tggagattt gccaacgaac cggatacccg tccgcaagg 1260
gcacgggaat atttcgccc actggcgga gcaacgcgt aactcgacc gacgcgtccg 1320
atcacctcg tcaatgtaat gttctcgac gtcacaccg ataccatcag cgatctttt 1380
gatgtgctgt gcctgaaccg ttattacgga tggatgtcc aaagcggcga ttggaaacg 1440
gcagagaagg tactggaaa agaactctg gcctggcagg agaaactgca tcagccgatt 1500
atcatcaccg aatacggcgt ggatacgtt gccgggctgc actcaatga caccgacatg 1560
tggagtgaag agtatcagtg tgcattgct gatatgtac accgcgtctt tgatcgcgtc 1620
agcgccgtc tcggtgaaca ggtatggaat ttcgccgatt ttgcgacct gcaaggcata 1680
ttgcgcttg gcggaacaa gaaaggatc ttactcgcg accgcaaacc gaagtcggcg 1740

gcttttctgc tgcaaaaacg ctggactggc atgaacttcg gtgaaaaacc gcagcagggg 1800

ggcaacaat ga 1812

<210> 32

<211> 2001

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2001)

<223> Химерна кодуюча послідовність, яка складається з нативної GUS-кодуючої послідовності E. coli з інтроном, який вирізається.

<400> 32

atggtcctgc ctgtagaaac cccaaccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60
ttcagtcctg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttaca 120
gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt ttaacgatc agtcgccga tgcagatatt 180
cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240
ggccagcgta tcgtgctcgc ttctgatcgc gtcactcatt acggcaaaagt gtgggtcaat 300
aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat tgaagccga tgcacgccg 360
tatgttattg cgggaaaaag tttacgtaag ttctgcttc taccttgat atatataaa 420
taattatcat taattagtag taataataa tttcaaatat tttttcaaa ataaaagaat 480
gtagtatata gcaattgctt ttctgtagtt tataagtgtg tatattttaa ttataactt 540
ttctaataa tgaccaaaa ttgttgatgt gcagggtatca ccgtttgtgt gaacaacgaa 600
ctgaactggc agactatccc gccgggaatg gtgattaccg acgaaaacgg caagaaaaag 660
cagtcctact tccatgattt cttaactat gccggaatcc atcgacgcgt aatgctctac 720
accacgccga acacctgggt ggacgatatc accgtggtga cgcattgctgc gcaagactgt 780
aaccacgcgt ctgttgactg gcagggtggt gccaatggtg atgtcagcgt tgaactgcgt 840
gatgcggatc aacagggtgt tgcaactgga caaggcacta gcgggacttt gcaagtgtgt 900
aatccgcacc tctggcaacc ggggtgaagg ttctctatg aactgtgcgt cacagccaaa 960
agccagacag agtgtgatat ctaccgcgtt cgcgtcggca tccggtcagt ggcagtgaag 1020
ggcgaacagt tctgattaa ccacaaaccg ttctacttta ctggctttgg tcgtcatgaa 1080
gatgcggact tgcgtggcaa aggattcgat aacgtgctga tgggtgcacga ccacgcatta 1140
atggactgga ttggggccaa ctctaccgt acctcgatt acccttacgc tgaagagatg 1200
ctcagctggg cagatgaaca tggcatcgtg gtgattgatg aaactgctgc tgtcggcttt 1260
aacctctctt taggcattgg ttctgaagcg ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcgaa 1320
gaggcagtcg acggggaaac tcagcaagcg cacttacagg cgattaaaga gctgatagcg 1380
cgtgacaaaa accaccaag cgtggtgatg tggagtattg ccaacgaacc ggatacccg 1440
ccgaagggtg cacgggaata ttctgcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgaccg 1500
acgcgtccga tcactgcgt caatgtaatg ttctgcgacg ctacacccga taccatcagc 1560
gatctctttg atgtgctgtg cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat 1620
ttggaacggg cagagaagggt actggaaaaa gaacttctgg cctggcagga gaaactgcat 1680
cagccgatta tcacaccga atacggcgtg gatacgttag ccgggctgca ctcaatgtac 1740
accgacatgt ggagtgaaga gtatcagtggt gcatggctgg atatgtatca ccgcgtctt 1800
gatcgcgta cgcgcgtcgt cgggtgaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg 1860
caaggcatat tgcgcgttgg cggtaacaag aaagggatct tactcgcgca ccgcaaaccg 1920
aagtcggcgg cttttctgt caaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaaccg 1980
cagcaggagg gcaacaatg a 2001

<210> 33

<211> 435

<212> ДНК

<213> Setaria italica

<400> 33

ggcgcccttt gagaagaagc ttttgtctg ctgcgcttat catgtttgt ggcttctgtg 60
ttgtgattct tgatctgcc ctgtctatca ttgtattgt actgtcctaa taagtgttac 120
ttgtgagggt attactgtgt ctggttattt acctagagga ggaattattg tctgtattt 180
ctggttttgc tgttatgta atgggtgaacc aaagaatgaa gctgcaggct actttgagaa 240
ggaaggggac ctgctgcttt ctatctgtc atgcgtgatt actgaacag tcctgatgat 300
ctattaatgt tctttgttca gtgcaagtgt ttggtgtagc tccaacagggt agtgtttatg 360
tttgtgaag cagcaatggc cgactgtatg tgtttgtga agctgcaacc tgctgtgtct 420
aactgaacat gcaga 435

<210> 34

<211> 2219

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2219)
<223> Група химерних транскрипційних регуляторних елементів експресії (EXP).
<400> 34

attatggcca attattatc ggctgtgccc tggcaggatg agtgtagtag tgtacctaat 60
ttggtaggca atgggtttga gtagggccaa taaatgtgca ggttacatt tgggtgcat 120
gttagttcat aactcatac acttccattt ttgtacgtcg gcgatgttcc aaccagaaca 180
gattatgttt ccttgggact gtaaatttct tcatcgctcc atcccaatga acttgcaaga 240
gattcgtgtt agcaaccaaa attgctctgt ccttcccaaa aagcattgcc tctggatctt 300
ttccgatcaa gatcagaaac cctatatgta ttgttctat gttctgctgt gggctgttgg 360
ttctgtcac ccttaaaact ctctgtttgg taccagata aatacaaaatt cggctgttgg 420
gtagaaaaac cgcctacgaa cactggtttc acctataag actactgcac tgtttctagc 480
aggctattt ttctcttctg tttttatatt ccaatgtata catattaatg ttatcgagc 540
tatgatctta taaatttga catgcttcaa tttttctaa aaacttgaat aacagtatgt 600
aaaacctagg ttgatgttcc aaatgaactt attaacatt ttacgttgaa acagtacatc 660
gcgaatggca tattatttgg ttgcatttat tctaaacacc taaaatgga attgaaaac 720
gggctctaag ttgagagaa gttaagggt aatagtattc taaacacttc aagtttgaga 780
tccaaaataa ttaatctctc acctatcacc tccaatcaag ttgttatca gtttatgcca 840
tgtacatgta tcgtgtgttt gttatttcac ctcatcttgc ctatgtatct actactattg 900
cgctaacttc aaatattaga tgacatgtaa actaaaatct ttggaaagat taataggata 960
cccgcgggtg ctgatattcg ttctaaaaa tgttgaatct aactatttgt aaatattgat 1020
atattttca gaaatgttgg atttagtctt gtgaaatgtt gaaccgatat ctctgatatg 1080
gatttaatgg gcttaaagct tccactagcc gtgtgcatgg gcgaaaaaaa atcttgcca 1140
agtgttactc cgtcgcggcc acacgccaca agtctctccg gccctcgtc gcccttacc 1200
ccatcgtacc cgcacacagg cgcgccacca gtggcgccgc ggatgcgcct catctcccg 1260
gcggccacct cgcgcggttt agatttcct gggcccccct cgcggtaccg tcatatatt 1320
ttggcgctc ttctctgcyg cccctctct cccgaaccgc agataccacc gattcggcag 1380
ctgaacacaa gcaacaagca agtgatcccgc gaccgaccgt ctccggtacg cgctactcc 1440
gccctctgcc ttgttactg ccacgtttct ctgaatgctc tcttgttgg tgattgtga 1500
gagtgtttta gctggatcta gaattacact ctgaaatcgt gttctgcctg tgctgattac 1560
ttgccgtct ttgtagcagc aaaatatagg gacatggtag tacgaaacga agatagaacc 1620
tacacagcaa tacgagaaat gtgtaattg gtgcttagcg gtatttatt aagcacatgt 1680
tgggtttata gggcacttgg attcagaagt ttgctgttaa tttaggcaca ggcttcatac 1740
tacatgggtc aatagtatag ggattcatat tataggcgat actataataa ttgttcgtc 1800
tgcagagctt attatttgc aaaattagat attcctattc tgttttgtt tgtgtgctgt 1860
taaattgta acgcctgaag gaataaataa aatgacgaa atttgatgt ttatctctgc 1920
tcctttattg tgaccataag tcaagatcag atgcacttgt tttaaattt gttgtctgaa 1980
gaaataagta ctgacagtat ttgatgcat tgatctgctt gttgttga acaaaattta 2040
aaaataaaga gtttctttt ttgtgtctc ctacccct gatggtatct agtatctacc 2100
aactgacact atattgtctc tctttacata cgtatcttgc tcatgcctt ctcctagt 2160
ttgaccagtg ttactcacat agtcttctgt catttcattg taatgcagat accaagcgg 2219

<210> 35
<211> 2224
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2224)
<223> Група химерних транскрипційних регуляторних елементів експресії (EXP).
<400> 35

attatggcca attattatc ggctgtgccc tggcaggatg agtgtagtag tgtacctaat 60
ttggtaggca atgggtttga gtagggccaa taaatgtgca ggttacatt tgggtgcat 120
gttagttcat aactcatac acttccattt ttgtacgtcg gcgatgttcc aaccagaaca 180
gattatgttt ccttgggact gtaaatttct tcatcgctcc atcccaatga acttgcaaga 240
gattcgtgtt agcaaccaaa attgctctgt ccttcccaaa aagcattgcc tctggatctt 300
ttccgatcaa gatcagaaac cctatatgta ttgttctat gttctgctgt gggctgttgg 360
ttctgtcac ccttaaaact ctctgtttgg taccagata aatacaaaatt cggctgttgg 420
gtagaaaaac cgcctacgaa cactggtttc acctataag actactgcac tgtttctagc 480
aggctattt ttctcttctg tttttatatt ccaatgtata catattaatg ttatcgagc 540
tatgatctta taaatttga catgcttcaa tttttctaa aaacttgaat aacagtatgt 600

aaaacctagg ttgatgtttc aaatgaactt atttaacatt ttacgttgaa acagtacatc 660
 gcgaatggca tattattttg ttgcatttat tctaaacacc ttaaaatgga atttgaaaac 720
 gggctctaag ttgagagaa gttaagggt aatagtattc taaacacttc aagtttgaga 780
 tccaaaataa ttaatctctc acctatcacc tccaatcaag ttgtttatca gtttatgcca 840
 tgtacatgta tcgctgggtt gtattttcac ctcatcttcg ctatgtatct actactattg 900
 cgctaatttc aaatattaga tgacatgtaa actaaaatct ttggaaagat taataggata 960
 cccgcgggtg ctgatatctg ttctaaaaa tgtgaaatct aactatttgt aaatattgat 1020
 atattttca gaaatgttg attagtctt gtgaaatgtt gaaccgatat ctctgatatg 1080
 gatttaattg gcttaaagct tccactagcc gtgtgcatgg gcgaaaaaaa atcttggcca 1140
 agtgttactc cgctcgggcc acacgccaca agtcctcccc gccctcgctc gcccttattc 1200
 ccatcgtacc cgccacacgg cgcgccacca gtggcgccgc ggatgcgcct catctccccg 1260
 gcggccacct cgcgcggttt agatttcctt gggccccctt cgcggtaccg tcacatattt 1320
 ttggcgctc ttctctgcg cccctctctt cccgaaccgc agataccacc gattcggcag 1380
 ctgaacacaa gcaacaagca agtgatcccg gaccggaccg accgtcttcg gtacgcgctc 1440
 actccgccct ctgcctttgt tactgccacg ttctctgaa tgctctcttg tgtggtgatt 1500
 gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt acactctgaa atcgtgttct gcctgtgctg 1560
 attactgcc gtcctttgta gcagcaaaat ataggacat ggtagtacga aacgaagata 1620
 gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta attggtgct tagcgttatt tatttaagca 1680
 catgttggtg ttatagggca ctggattca gaagttgtct gtttaattag gcacaggctt 1740
 catactacat ggttcaatag tatagggtt catattatag gcgatactat aataatttgt 1800
 tcgtctgcag agcttattat ttgccaaaat tagatattcc tattctgttt ttgtttgtgt 1860
 gctgttaaat tgttaacgcc tgaaggata aatataaatg acgaaatttt gatgtttatc 1920
 tctgtcctt tattgtgacc ataagtaag atcagatgca ctgttttaa atattgttgt 1980
 ctgaagaaat aagtactgac agtattttga tgcattgac tgctgtttg ttgtaacaaa 2040
 atttaaaaat aaagagtttc cttttgttg ctctcttac ctctgatgg tatctagat 2100
 ctaccaactg acactatatt gcttctttt acatacgtat ctgtctgat gccttctccc 2160
 tagtgtgac cagtgttact cacatagtct ttgctcattt cattgtaatg cagataccaa 2220
 gcgg 2224
 <210> 36
 <211> 2966
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2966)
 <223> Група химерних транскрипційних регуляторних елементів експресії.
 (EXP).
 <400> 36
 ggtccgattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc 60
 ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaggagg aagggtggctc ctacaaatgc 120
 catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tgggcccaaa 180
 gatggacccc caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cactgttca 240
 aagcaagtgg attgatgtga tgggtccgatt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga 300
 aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag 360
 gaagggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420
 tctgccgaca gtgggtccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 480
 gacgttcaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atcggaagct aactagtcac 540
 ggcgaataca tgacgacatc ggctacaac gcacaacttc ttggcataaa agcttcaatt 600
 tcaatgcccc tatctggaag ccttaggcgc cgcgcaaatg taaaacattc gcttcgcttg 660
 gctgttatc caaaatagag tatggacctc cgacagattg gcaacccgtg ggaatcga 720
 aatggctcca tctgccctt tctgaagga atcaggaaac ggccctcacc tctggcgga 780
 gtgtagatat gtgaaagaat ctaggcgaca ctgcagact ggacaacatg tgaacaaata 840
 agaccaactg tatggcaaca agcctcgacg ctactcaagt ggtgggaggc caccgcatgt 900
 tccaacgaag cgccaaagaa agccttgacg actctaattg tattagtcgc ctaggatatt 960
 tggaatgaaa ggaaccgcag agtttttcag caccaagagc ttccggtggc tagtctgata 1020
 gccaaaatta aggaggatgc caaaacatgg gtcttgccgg gcgcgaaaca ccttgatagg 1080
 tggcttacct ttaacatgt tcgggcaaaa ggccttgaga cggtaaagt ttctatttgc 1140
 gcttgccat gtacaattt attcctctat tcaatgaaat tgggtgctca ctggttcatt 1200
 aaaaaaaaaa gaatctagcc tgttcgggaa gaagaggatt ttattcgtga gagagagaga 1260
 gagagagaga gagagagga gagagaagga ggaggaggat ttacaggctt cgcattgccc 1320
 aacctctgct tctgtggcc caagaagaat cccaggcgcc catgggctgg cagttacca 1380
 cggacctacc tagcctacct tagctatcta agcggggcga cctagtagct acgtgcctag 1440

tgtagattaa agttggcggg ccagcaggaa gccacgtgc aatggcatct tcccctgtcc 1500
ttcgcgtacg tgaanaaaaaa cccaggtaag cttagaatct tcttcccgt tggactggga 1560
caccaccaa tcccacatg ccccgatatt cctccggtct cgggtcatgt gatgtcctct 1620
cttgttgat cacggagcaa gcattcttaa acggcaaaaag aaaatcacca acttgctcac 1680
gcagtcacgc tgcaccgcgc gaagcgacgc ccgataggcc aagatcgga gataaaaaa 1740
caaccaatga tcataaggaa acaagcccgc gatgtgtcgt gtgcagcaat ctgggtcatt 1800
tgcgggatcg agtgcctcac ggctaacc aaattcggcc gatgattaa cacattatca 1860
gcgtagatgt acgtacgatt tgttaattaa tctacgagcc ttgctagggc aggtgttctg 1920
ccagccaatc cagatcgccc tctatgcac gctcacatga tggcagggca ggggtcacat 1980
gagctctaac ggtcgattaa ttaatcccg ggctcgacta taaatacctc cctaatacca 2040
tgatcaaaac catctcaagc agcctaata tctccagctg atcaagagct cttaattagc 2100
tagctagtga ttagtgcgc ttgtgatcga tcatctcgg gtacgtagca cggaccggac 2160
cgaccgtctt cggtagcgc tactccgcc ctctgccttt gttactgcca cgttctctg 2220
aatgtctctt tgtgtggtga ttgtgagag tggtttagct ggatctagaa ttacactctg 2280
aaatcgtgtt ctgcctgctg tgattacttg ccgtccttg tagcagcaa atataggac 2340
atggtagtac gaaacgaaga tagaacctac acagcaatac gagaaatgtg taattgggtg 2400
cttagcggta ttatttaag cacatgttg tttataggg cacttggtt cagaagttg 2460
ctgtaattt aggcacaggc ttactactac atgggtcaat agtataggga tcatattat 2520
aggcgatact ataataatt gtctgtctgc agagctatt attgcaaaa attagatatt 2580
cctattctgt tttgttgtt gtgtgttaa attgtaacg cctgaaggaa taaataaaa 2640
tgacgaaatt ttgatgtta tctgtctcc tttattgtga ccataagtca agatcagatg 2700
cactgtttt aaatattgtt gtctgaagaa ataagtactg acagtattt gatgcattga 2760
tctgttgtt tgtgttaaca aaatttaaaa ataaagagt tctttttg tctctcctt 2820
acctctgat ggtatctagt atctaccaac tgacactata ttgcttctt ttacatactg 2880
atctgtctg atgcctctc ctagtgttg accagtgtt ctcacatagt cttgtctat 2940
ttcattgtaa tgcagatacc aagcgg 2966

<210> 37

<211> 2005

<212> ДНК

<213> *Zea mays* subsp. *mexicana*

<400> 37

gtcgtgcccc tctctagaga taaagagcat tgcattgtta aagtataaaa aattaccaca 60
tattttttg tcacacttat ttgaagtga gtttatctat ctctatacat atatttaaac 120
ttactctac aaataatata gtctataata ctaaaataat attagtgtt tagaggatca 180
tataaataaa ctgctagaca tggctaaag gataattgaa tttttgaca atctacagtt 240
ttatctttt agtgtgcatg tgatctctt gttttttt caaatagctt gacctatata 300
atacttcac tttttatta gtacatccat ttaggattta gggttgatgg ttctataga 360
ctaatttta gtacatccat ttattctt ttagtctta aatttttaa aactaaaact 420
ctattttagt tttttatta ataattaga tataaatga aataaataa attgactaca 480
aataaaacaa atacccttta agaaataaaa aaactaagca aacattttc ttgttcgag 540
tagataatga caggctgttc aacgcgctgc acgagtctaa cggacaccaa ccagcgaacc 600
agcagcgtcg cgtcgggcca agcgaagcag acggcacggc atctcttag ctgcctctgg 660
acctctctg agagtccgc tccaccgtg gacttgctcc gctgtcggca tccagaaatt 720
gcgtggcgga gcggcagacg tgaggcgga cggcagggc cctctctc ctctacggc 780
accggcagct acgggggatt ctttccac cgtcctctg ctttccctc ctgcccgc 840
gtaataaata gacacccct ccacaccctc ttcccaac ctgtgttcg ttcgagcgc 900
acacacacgc aaccagatct ccccaaatc cagccgtcg cacctccgt tcaaggtag 960
ccgtcatcc tcccccccc cctctctta cttctctag atcggcgatc cgtccatgg 1020
ttagggcccg gtatgtctac ttctgtcat gttgtgtta gagcaacat gttcatgtc 1080
atgttgtga tgatgggc tgggtggcg gtcgtctag atcggagtag gatactgtt 1140
caagctacct ggtggattta ttaattttg atctgtatgt gtgtgccata catctcata 1200
gttacgagtt taagatgat gatgaaata tcatctagg ataggatac atgttgatgc 1260
gggtttact gatcatata cagatgtct ttttctcg ctgggttg atgatgtg 1320
ctgggtgggc ggtcgttca gatcggagta gaatactgt tcaactacc tgggtgatt 1380
attaaaggat aaagggtcgt tcatagcgg agtagaatac tgttcaaac tacctggtg 1440
atttataaa ggtatgtat gtatgtcct acatctcat agttacgagt ttaagatgat 1500
ggatggaaat atcatctag gataggata catgttgat cgggtttac tgatcatat 1560
acagagatgc tttttcgc ttggtgtga tgatgggc tgggtggcg gtcgtctag 1620
atcggagtag aatactgtt caaactacct ggtggattta ttaattttg atcttatgt 1680
gtgtgccata catctcata gttacgagtt taagatgat gatgaaata ttgatctagg 1740
ataggatac atgttgatg gggtttact gatcatata catgatgga tatcggcac 1800
ctattcatat gcttaacct tgagtaccta tctattataa taaacaagta tgtttataa 1860

ttattttgat ctgatatatac ttggatgatg gcatatgcag cagctatatg tggattttt 1920
 agccctgcct tcatacgcta ttatttgct tggtagtgt tctttgtcc gatgctcacc 1980
 ctgtgttgg gtgatacttc tgcag 2005
 <210> 38
 <211> 804
 <212> ДНК
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 38
 accgtcttcg gtacgcgctc actccgccct ctgccttgt tactgccacg ttctctgaa 60
 tgctctcttg tgtggtgatt gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt acactctgaa 120
 atcgtgttct gcctgtgctg attacttgcc gtccttcta gcagcaaaat atagggacat 180
 ggtagtacga aacgaagata gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttggtgct 240
 tagcggattt tatttaagca catgttggtg ttatagggca ctggattca gaagttgct 300
 gttaatttag gcacaggcct cactactacat ggtcaatag tatagggatt catattatag 360
 gcgatactat aataattgtg tctgtgcag agcttattat ttgcaaaat tagatattcc 420
 tattctgttt ttgttgtgt gctgttaaat tgtaacgcc tgaaggaata aatataaatg 480
 acgaaatttt gatgtttatc tctgctcctt tattgtgacc ataagtcaag atcagatgca 540
 ctgttttaa atattgtgt ctgaagaaat aagtactgac agtatttga tgcattgac 600
 tgctgtttg ttgtaacaaa atttaaaaat aaagagtttc cttttgtg ctctcctac 660
 ctctgatgg tatctagat ctaccaactg acactatatt gctctctt acatacgtat 720
 ctgtctgat gccttctcc tagtgttgac cagtgttact cacatagtct ttgctcatt 780
 cattgtaatg cagataccaa gcgg 804
 <210> 39
 <211> 253
 <212> ДНК
 <213> *Agrobacterium tumefaciens*
 <400> 39
 gatcgttcaa acatttgga ataaagttc ttaagattga atcctgttc cggcttgcg 60
 atgattatca tataattct gttgaattac gtaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
 atgacgttat ttatgagatg ggttttatg attagatcc cgcaattata catttaatac 180
 gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat ttcgcgcgc ggtgtcatct 240
 atgttactag atc 253
 <210> 40
 <211> 300
 <212> ДНК
 <213> *Oryza sativa*
 <400> 40
 attaatgat cctccgatcc ctaattacc ataccattac accatgcac aatatccata 60
 tatatataaa cctttcgca cgtactata ctatgtttg tcatacatat atatgtgctg 120
 aacgatgat ctactactga tatgatatga ttgatccac agcctgatct ctgtatctg 180
 ttattgtat accgtcaaat aaaagttct tccactgtg ttaataatta gctactctca 240
 tctcatgaac cctatatata actagttaa ttgtgtgca attgaacatg atgatcgatg 300
 <210> 41
 <211> 1446
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1446)
 <223> Група химерних транскрипційних регуляторних елементів експресії.
 (EXP).
 <400> 41
 ggtccgattg agactttca acaaaggga ataccggaa acctcctcgg attccattgc 60
 ccagctatct gtcacttat tgtgaagata gtgaaaagg aagggtggctc ctacaaatgc 120
 catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tgggtccaaa 180
 gatggacccc caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca 240
 aagcaagtgg attgatgtga tgggtccgatt gagactttc aacaaagggt aatatccgga 300
 aacctcctcg gattccattg ccagctatc tgtacttta ttgtgaagat agtggaaaag 360
 gaagggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420
 tctgccgaca gtgggtccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 480
 gacgttccaa ccagctctc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg 540
 gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gaccctcct ctatataagg aagttcattt 600

catttggaga ggacacgctg acaagctgac tctagcagat ctaccgtctt cggtagcgc 660
tcactccgcc ctctgcttt gttactgcc cgtttctctg aatgctctct tgtgtggtga 720
ttgctgagag tggtttagct ggatctagaa ttacactctg aaatcggtt ctgcctgtgc 780
tgattacttg ccgtcctttg tagcagcaaa atatagggac atggtagtac gaaacgaaga 840
tagaacctac acagcaatac gagaaatgtg taatttggtg ctagcggta ttatttaag 900
cacatgttg tgttatagg cacttggtt cagaagttg ctgttaatt aggcacaggc 960
tcatactac atgggtcaat agtataggga tcatattat aggcgatact ataataatt 1020
gttcgtctgc agagcttatt atttgccaaa attagatatt cctattctgt tttgtttgt 1080
gtgctgttaa attgttaacg cctgaaggaa taaatataaa tgacgaaatt tggatgtta 1140
tctctgctcc ttattgtga ccataagtca agatcagatg cactgtttt aaatattgtt 1200
gtctgaagaa ataagtactg acagtatttt gatgcattga tctgctgtt tgttgaaca 1260
aaatttaaaa ataaagagtt tcctttttg tgcctcctt acctctgat ggtatctagt 1320
atctaccaac tgacactata ttgcttctt ttacatacgt atcttgctcg atgcctctc 1380
cctagtgttg accagtgtta ctacatagt ctttgctcat tcattgtaa tgcagatacc 1440
aagcgg 1446

<210> 42

<211> 1653

<212> ДНК

<213> Photinus pyralis

<400> 42

atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctt agaggatgga 60
accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tgaacaatt 120
gctttacag atgcacatat cgagggtgaac atcacgtacg cggaatactt cgaaatgtcc 180
gttcggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgt 240
tgcagtgaat actctctca attcttatg ccggtgttg ggcgttatt tatcggagtt 300
gcagttgctg ccggaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgaacatt 360
tcgcagcta ccgtagtgtt tgttccaaa aaggggtgc aaaaaattt gaacgtgca 420
aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttaccaggga 480
tttcagtcga tgacacgtt cgtcacatct catctacct ccggtttta tgaatacgt 540
ttgtaccag agtctcttga tcgtgacaaa acaattgcac tgaatgaa ttctctgga 600
tctactgggt tacctaagg tgtggccct ccgcatagaa ctgcctcgt cagattctc 660
catgccagag atcctatttt tggcaatcaa atcattccgg atactcgtat ttaagtgtt 720
gttcattcc atcacggtt tggatgttt actacactcg gatattgat atgtggatt 780
cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgttt tacgatccct tcaggattac 840
aaaattcaaa gtgcgttct agtaccaccc ctatttcat tcttcgcaa aagcactctg 900
attgacaaat acgatttatc taatttac gaaattgct ctgggggctg accttttcg 960
aaagaagtcg gggaagcgt tgcaaacgc ttccatctc caggatagc acaaggatat 1020
gggctcactg agactacatc agctattctg attacaccg agggggatga taaaccgggc 1080
gcggtcgga aagttgttcc atttttgaa gcgaaggtg tggatctgga taccgggaaa 1140
acgctggcg ttaatcagag aggcgaata tgttcagag gacatgat tatgtccgt 1200
tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatgatg gctacattct 1260
ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttctca tagtgaccg ctggaagtct 1320
ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggatcgat attgttaca 1380
cacccaaca tctcgacgc gggcgtggca ggtctcccg acgatgacgc cgtgaactt 1440
cccgcgcggt ttgttttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat 1500
tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtt gttgtggac 1560
gaagtaccga aaggtctac cggaaaactc gacgcaagaa aatcagaga gatcctcata 1620
aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa 1653

<210> 43

<211> 936

<212> ДНК

<213> Renilla reniformis

<400> 43

atggcttcca aggtgtacga ccccgagcaa cgcaaacgca tgactactgg gcctcagtgg 60
tggtctcgt gcaagcaaat gaacgtgctg gactccttca tcaactacta tgattccgag 120
aagcacgcgc agaacgccgt gattttctg catggtaacg ctgcctccag ctacctgtg 180
aggcacgtcg tgcctcacat cgagcccggt gctagatgca tcatccctga tctgatcgg 240
atgggtaagt ccggcaagag cggaatggc tcatatgcc tcttgatca ctacaagtac 300
ctcaccgctt ggttcgagct gctgaacctt ccaaagaaaa tcatctttgt gggccacgac 360
tggtgggctt gctggcctt tctactacc tacgagcacc aagacaagat caaggccatc 420
gtccatgctg agagtgcgt ggacgtgatc gactcctggg acgagtggcc tgacatcgag 480
gaggatatcg ccctgatcaa gagcgaagag ggcgagaaaa tgggtctga gaataactc 540

ttcgtcgaga ccatgctccc aagcaagatc atgcggaaac tggagcctga ggagttcgct 600
gcctacctgg agccattcaa ggagaagggc gaggttagac ggcctaccct ctctggcct 660
cgcgagatcc ctctcgtaa gggaggcaag cccgacgtcg tccagattgt ccgcaactac 720
aacgcctacc ttggggccag cgacgatctg cctaagatgt tcatcgagtc cgaccctggg 780
ttctttcca acgctattgt cgaggagct aagaagttcc ctaacaccga gttcgtgaag 840
gtgaagggcc tccactcag ccaggaggac gctccagatg aaatgggtaa gtacatcaag 900
agcttcgtgg agcgcgtgct gaagaacgag cagtaa 936

<210> 44

<211> 675

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(675)

<223> Група химерних транскрипційних регуляторних елементів експресії. (EXP).

<400> 44

gggtccgatgt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
cccagctatc tgtacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaagggtggct cctacaaatg 120
ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtgggtccaa 180
agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttcaa ccacgtcttc 240
aaagcaagtg gattgatgtg atgggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg 300
gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 360
aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 420
cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag 480
aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 540
gggatgacgc acaatccac tatccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat 600
ttcatttga gaggaacat ctccacaca ctcaagccac actattggag aacacacagg 660
gacaacacac cataa 675


```

CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CAGCAAGTCGTTGCCACCGGCCAGGGCACCAGCGGCACCCTCCAAGTCGTCAACCCCTCAC
CR-Ec.uidA-1:1:4 CAACAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCACTAGCGGGACTTTGCAAGTGGTGAATCCGCAC
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTCTGGCAGCCTGGCGAGGGCTACCTCTACGAGCTGTGCGTCACCGCCAAGAGCCAGACT
CR-Ec.uidA-1:1:4 CTCTGGCAACCGGGTGAAGGTTATCTCTATGAAGTGTGCGTCACAGCCAAAAGCCAGACA
***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GAGTGCACATCTACCCTCTCCGCGTCGGCATCAGGAGCGTCGCTGTCAAGGGCGAGCAG
CR-Ec.uidA-1:1:4 GAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAG
***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TTCCTCATCAACCACAAGCCTTTCTACTTCACTGGTTTCGGCCGCCACGAGGACGCTGAC
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCGGAC
***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTGAGGGGCAAGGGTTTCGACAACGTCCTGATGGTCCACGACCACGCTCTGATGGACTGG
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTGCGTGGCAAAGGATTCGATAACGTCCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGG
** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 ATCGGTGCCAACAGCTACAGGACCAGTCACTACCCGTACGCTGAGGAGATGCTGGACTGG
CR-Ec.uidA-1:1:4 ATTGGGGCCAACTCCTACCGTACCTCGCATTACCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGG
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCTGACGAGCACGGTATCGTCGTGATCGACGAGACTGCTGCGGTGCGTTTCAACCTGTCT
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCAGATGAACATGGCATCGTGGTGATTGATGAACTGCTGCTGTGCGGCTTTAACCTCTCT
** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTGGGCATTGGTTTCGAGGCTGGGAACAAGCCGAAGGAGCTGTACTCTGAGGAAGCTGTC
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTAGGCATTGGTTTCGAAGCGGGCAACAAGCCGAAAGAACTGTACAGCGAAGAGGCAGTC
* ***** ** ** ***** ** ***** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 AACGGCGAGACTCAGCAAGCTCATCTCCAGGCGATTAAAGGAGCTGATTGCCAGGGACAAG
CR-Ec.uidA-1:1:4 AACGGGGAACTCAGCAAGCGCACTTACAGGCGATTAAAGAGCTGATAGCGCGTGACAAA
***** ** ***** ** * ***** ***** ** * *****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 AACCATCCGTCTGTGCTGATGTGGTCTATTGCGAATGAGCCGGACACCAGACCGCAAGGG
CR-Ec.uidA-1:1:4 AACCACCAAGCGTGGTGTGAGTATTGCCAACGAACCGGATACCCGTCCGCAAGGT
***** ** ** ***** ***** ** ** ***** ** * *****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCGCGTGAATACTTCGCGCCGCTGGCGGAGGCGACTCGCAAAGTGGACCCAACCCGTCCA
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCACGGGAATATTTTCGCGCCACTGGCGGAAGCAACGCGTAAACTCGACCCGACGCGTCCG
** ** ***** ***** ***** ** ** ***** ***** ** *****

```

Fig. 1b

```

CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 ATCACGTGCGTCAATGTCATGTTCTGCGACGCCCATACGGATACGATCTCGGACCTGTTC
CR-Ec.uidA-1:1:4 ATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGATACCATCAGCGATCTCTTT
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GATGTTCTTTGTCTCAATCGGTACTATGGGTGGTATGTTTCAGAGCGGGGATCTTGAGACG
CR-Ec.uidA-1:1:4 GATGTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCAAAGCGGCGATTGGAAACG
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCGGAGAAGGTTCTTGAGAAGGAACTCTGGCGTGGCAAGAGAAGCTCCATCAGCCGATC
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCAGAGAAGGTACTGGAAGAAAGAACTTCTGGCCTGGCAGGAGAACTGCATCAGCCGATT
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 ATTATCACGGAGTACGGGGTTGACACACTTGCGGGCCTTCACAGTATGTACACAGATATG
CR-Ec.uidA-1:1:4 ATCATCACCGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACTCAATGTACACCGACATG
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TGGTCGGAGGAATACAGTGTGCATGGTTGGATATGTACCATCGTGTCTTCGACCGGGTT
CR-Ec.uidA-1:1:4 TGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGCATGGCTGGATATGTATCACC CGCTCTTTGATCGCGTC
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TCAGCGGTTGTCGGCGAACAAGTCTGGAACCTTCGCAGACTTCGCCACGAGCCAAGGGATA
CR-Ec.uidA-1:1:4 AGCGCCGTCGTCGGTGAACAGGTATGGAATTTGCGCGATTTTGCAGCTCGCAAGGCATA
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTGCGGGTAGGAGGGAACAAGAAGGGAATCTTCACACGGGATCGGAAGCCCAAGTCAGCA
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTGCGCGTTGGCGGTAACAAGAAAGGGATCTTCACTCGCGACCGCAAACCGAAGTCGGCG
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCCTTCCTGTTGCAGAAGCGATGGACAGGAATGAACTTCGGAGAAAAGCCACAGCAAGGC
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCTTTTCTGCTGCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTGAAAAACCGCAGCAGGGA
*****
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GGAAAGCAGTGA
CR-Ec.uidA-1:1:4 GGCAAACAATGA
*****

```

Fig. 1c