

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 відноситься 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 насіннина, 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" відноситься 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_anno-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* і *Renilla reniformis*, відповідно.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Цей винахід відноситься 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 відноситься до способів їх модифікації, створення і застосування. Цей винахід також відноситься 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" відноситься до дволанцюгової молекули ДНК клітинного або синтетичного походження, тобто до полімеру дезоксирибонуклеотидних основ. Використаний у цьому документі термін "ДНК послідовність" відноситься 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" відноситься 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" відноситься 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 відноситься 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, відноситься до молекул ДНК, які мають ген-регуляторну активність. Термін "ген-регуляторна активність", який використовується в цьому документі, відноситься 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, енхансери 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 енхансери, 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 транслявана 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" відноситься 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 енхансерних 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" відноситься 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" відноситься 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-1s1*) 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" відноситься 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" відноситься 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 (СІТ) 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, аналізу 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 цьому документі термін "химерний" відноситься 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" відноситься 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" відноситься 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 транзійтних 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" відноситься 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" відноситься 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 плазмід (Ti), що мають області правої граничної ділянки (RB або AGRtu.RB) і лівої граничної ділянки (LB або AGRtu.LB) Ti-плазмід, ізольованої з *Agrobacterium tumefaciens*, яка містить T-ДНК, яка разом із перенесенням молекул, що забезпечується клітинами *A. tumefaciens*, дозволяє інтеграцію T-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 кодує 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 загальноприйнятні 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-плазмід *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 кодуєчу 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" відноситься 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" відноситься 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" відноситься 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" відноситься 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 секретиються (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 ендегенного 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 ендегенного 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 грибових 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" відноситься 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 ендегенних 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 використовуються 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" відноситься до введення молекули ДНК до реципієнтного хазяїна. Використаний у цьому документі термін "хазяїн" відноситься 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" відноситься 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" відноситься 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 карбіду 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); Snee 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 відноситься до частин рослини відповідно до цього винаходу. Частини рослин включають, але не обмежуються цими, листя, стебла, корені, бульби, насіння, ендосперм, сім'ябруньку та пилкок. 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 багатого 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 відповідній 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.

[00086] 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	<i>Coix lacryma-jobi</i>
L-Cl.RCc3:2	2	<i>Coix lacryma-jobi</i>
P-Ds.RCc3_1:1	3	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_1:1	4	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
P-Ds.RCc3_2:1	5	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_2:1	6	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
P-Ds.RCc3_3:1	7	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
L-Ds.RCc3_3:1	8	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
P-MISgr.RCc3_1:1	9	<i>Miscanthus sinensis</i> f. <i>gracillimus</i>
L-MISgr.RCc3_1:1	10	<i>Miscanthus sinensis</i> f. <i>gracillimus</i>
P-MISgr.RCc3-2:2	11	<i>Miscanthus sinensis</i> f. <i>gracillimus</i>
L-MISgr.RCc3-2:1	12	<i>Miscanthus sinensis</i> f. <i>gracillimus</i>
P-Td.RCc3_1:1	13	<i>Tripsacum dactyloides</i>
L-Td.RCc3_1:1	14	<i>Tripsacum dactyloides</i>
P-Td.RCc3_2:1	15	<i>Tripsacum dactyloides</i>
L-Td.RCc3_2:1	16	<i>Tripsacum dactyloides</i>
P-Td.RCc3_3:1	17	<i>Tripsacum dactyloides</i>
L-Td.RCc3_3:1	18	<i>Tripsacum dactyloides</i>

Таблиця 1.

Промоторні та лідерні послідовності RCc3, ізольовані з різних видів трав.

Опис послідовності	SEQ ID №:	Рід/вид
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, які 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 плазмиди 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 плазмиди 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. Р₀ 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 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 Microtmax 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 плазмиди 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 транзійентної експресії

Експресія гена GUS під контролем регуляторного елемента, який містить один або більше енхансерів, оцінюється при випробуваннях рослин зі стабільною трансформацією або із транзійентною експресією для визначення впливу енхансерного елемента на експресію трансгена. Модифікації одного або більше енхансерних елементів або дуплікації 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 -глюкуронідази (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 нативної 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 конструктів і відповідні послідовності EXP та GUS.

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 Microtmax 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.

Тканина	pMON144050 EXP-CaMV.35S- enh+Os.Rcc3+Zm.DnaK:1:5/CR- Ec.uidA-1:1:4	pMON122597 EXP-CaMV.35S- 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.

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, епідермісі, 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

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 плазмиди 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 (плазмиди) 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
pMON264146	P-Cl.RCc3:3 L-Cl.RCc3:2	1 2	5328064,75	105434	253107,5	50,73	21,15
pMON264148	P-Ds.RCc3_1:1 L-Ds.RCc3_1:1	3 4	773613	147918	338149,5	5,23	2,28
pMON264088	P-Ds.RCc3_2:1 L-Ds.RCc3_2:1	5 6	2883555,75	129947,5	309268,5	22,33	9,45
pMON264107	P-Ds.RCc3_3:1 L-Ds.RCc3_3:1	7 8	1093785	124864,75	306178,75	8,70	3,55
pMON264186	P-MISgr.RCc3_1:1 L-MISgr.RCc3_1:1	9 10	2613839,75	128887,25	301412,75	20,45	8,83
pMON264187	P-MISgr.RCc3-2:2 L-	11 12	2370706,25	149383,5	370443,75	15,95	6,53

	MISgr.RCc3-2:1						
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	7506585,75	150939,25	368035,5	50,15	20,88
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	4447254,25	155356,25	364604,5	28,78	12,40
pMON264147	P-Td.RCc3_3:1 L-Td.RCc3_3:1	17 18	1100118,75	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 pMON264108 та pMON264206. 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
pMON264146	P-CI.RCc3:3 L-CI.RCc3:2	1 2	25,15	61,31	20,71	42,64	35,96	95,19	298	125,12	21,97	186,52
pMON264148	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
pMON264088	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
pMON264107	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		
pMON264186	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
pMON264187	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		
pMON264049	P-Td.RCc3_1:1 L-Td.RCc3_1:1	13 14	283,86	238,31								
pMON264050	P-Td.RCc3_2:1 L-Td.RCc3_2:1	15 16	51,82	653,38								
pMON264147	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
pMON264166	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.

Таблиця 10.

Показники співвідношення експресії корінь / лист для стабільно трансформованих рослин кукурудзи.

Плазмідна конструкція	Промотор Лідер	SEQ ID №:	Середнє корінь / лист		
			V4	V7	VT
pMON264146	P-Cl.RCc3:3 L-Cl.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-Cl.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 gaatcaaac ccaacagggc tagaacgccc ggagagcgag 60
gttgacgttc aacctgctga gacagcaggg accctggcta aaccgacgaa aaccgatcta 120
gagaccggt tagatcgatc tagggtttcg ggctcctgtg ttgataactc tagaactcct 180
cccgggaaga cccgtagggg agaagcacgt agaggtgtc ctaggaccag caaggccgcc 240
tagaacgccg tcaagtctcg tcgggagacg cgccgaacag caaggtagaa ggaaaaaggg 300
gtaaaagggg agtagattga tttgatcga ttagggtcgg atgcctcaat cggccatgat 360
cctctcatat atatagaggg ggctggtctt atccaatag gaaacatctc cggatcacgat 420
ctccaagctt cctatccgga ctctatcaac atatagaatt caatccggac gtgacaaggt 480
aaccttgatt tcgccgatcc ttggatcgac cagatcggtc taatgggctt taccagcca 540
tactgatcaa caaatcgctc ttacaagaga aggatccaca tacttagcgt cggactcagc 600
aatcatcaca accataaggc ctccaaccag ggccacctgg tcggacataa catgagtgat 660
cggaaaccca aaatgatcag gccattcaa cttagaacat ctgatctctc aaaagacaaa 720
ttcgacctta atattacagg ccgaatactt ctctaaatt cattttatc tgtgacactt 780
ttgagtgtca acagtatgct tttcttgca aatattccct ttttatttc taccattag 840
ttactttggc cttccattt cattgtatgt aaaagtggat actaaagcta acgcaacaag 900
aacaaaaata aatagatccg gggatgacg tccccacgga tattttacta aaatatctc 960
tcacagatc tagaaatcc tcgggcccta tccatatagg gtggtatcac atccatatac 1020
ttatagtagg acagatgagg agatttttt accctcaatt ctaaaattca tcactttaat 1080
taaaggaatt taactcagga ccagagcggg gtcgagagag ccatatatgt aacaaaaata 1140
cctattagtt tagggcagca gcaataaac cattattcct ttgtcccctt attccgtctc 1200
cagctagcta aaagctgtac atatgattaa tcatcgacat cgtgcatgca atttgacgga 1260
aagtgcagg agcagccagg tgtatacacg tctgtagggt tcgctgcaca tcgatcacat 1320
ggatgatcat gcatccaaaa cacacgtacg tacacttgct ggtgcatgcc ttatgaaatg 1380
gaatactaca cgcagtcca caagttaagc acgcacaggc acacacacag agagacacag 1440
ttgctcgctc aatgcaattg gctggtctat aaataccacc gaagagaacc atcctaaaga 1500

<210> 2

<211> 86

<212> ДНК

<213> Coix lacryma-jobi

<400> 2

acacaccggg agcgattcga tccttcagaa gagctactgc tagctagcta gagctatcat 60
ctgatcggtg gcagcaatat aattca 86

<210> 3

<211> 594

<212> ДНК

<213> Digitaria sanguinalis (L.) Scop.

<400> 3

accaacaagc atcatgacaa tggcagcaaa gcattcgta gagacgacca acaagcatca 60
cgacactggc ggcaaagcat atcaaaacaa tgtaatgaga tacaatattg ttccataaag 120

aagcctacct gcatgatcct ttctaacaaa ctcaaaatga taagggccat gctctgttcg 180
gtgacaacct tcaaggcatc tactttgccca gaatttagct ttgttattac cagcttgta 240
ttagttcta ctatccagtc tcgaacaact tgggcgcct ttgtctatc atacctctac 300
atactgcct ccttgatcaa cacaacattc ttaacccaa tcccttgga ttgctgcatg 360
ttacaagggtg caaaacagcc agcccatatt gcaagtact aaactaaact atggtccaaa 420
tgcagcaatc ttgatcgcta gtactgtccg gcattatata tgaacaagt ccagatcacc 480
catctcatca cagtcacatg cattcgcgtt cagcgaaacc gtaacacac caccaactag 540
tcagcattgc accaatcttc ctccctataa 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 gcgccccac caaccttga tttgcctgc tgccttgta 60
gccaacgggt gtagtccac cctctcaaa cgtcgcaccg aagttctgtc gactcccaga 120
gaaaaatttg tatgtaacat atactattac tactacagct gaacacgtaa caatatgatc 180
ttatttgtgt atgccgaaag caccgtgcta aagaccacct atcgccctgg ttgggatcga 240
ggccttgctg ctacagccgtg tgcacagac gtgtgcgtgc atcgcacgac tggcatgtga 300
gttggtgttc ataaataatg tctaacaata ttaaggtaat tcctagtatg cgttgggac 360
atttttgat gttgatctt gcggcaggtc tcacccatgc atgacggatt gagaacaagg 420
gagactggac cagcatgtaa aagataatga tgaaggcgag ccatgttgac ggtgtaccgg 480
gacaggcaga cgcgggcca catcgaagag ggagatagcg tgcgtgctaa tgttttgtg 540
gctcgcagt tcaatgactc atacagattt cggtagcttg ctaaaatcat tcagctgtc 600
ggcaagcatg ggccaacaa tctagcaaca atccatgttt gccatcgatg caataggaag 660
taatagaatc cacttagctt ctagatctca cctggatcct cctttattt atatgcatat 720
attttgtggt agtggaggca cacatcttta tgttcatgg ataataattt gttatatga 780
tatctgtcca aataaataac gtacgtgtcc ttaactcta gactccagtt agattgatca 840
atgtagtgtt ctccatatt ccttttgtt ttgtgtgcc atgtctcaag catgcatgtg 900
gaatgaaaag ctggaagctt ggcacatcgc gctaaggag ccataccata aattaaacca 960
ttgtctgata tggccacaat tttttaaca agctatgcca tagtcattca tgtgccacgg 1020
ttgtgaatc gcctcaatta cgtgtggaac atgatggtt ttaaaacaac acttggtgat 1080
ttctattctg gcctactctt gcacttagga tcgtgttgtt agccatgtgc acatatttag 1140
ctagctagta gcaaaggcat gagtgagttg ctgatgggtt taaaataacc agcataagta 1200
ttcataatt tgaagtgaag caggttcacg aacatatgag aaaacttaca ttataatttg 1260
cttggtcaga tgaacaccta gctgattcct tggcgacgac aacatccctc cttgttccat 1320
actttctaa taattattt tctcccaaaa agtccatgc gctagcatca atgaagaaat 1380
ataagaaaaa tctcatatc cacatagtaa atagagcatt atgcgggtcca ttaggaatc 1440
acctggggag cacctgctg ctcaatcaca ctataaatac cacccataca 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

atcttcaaga tgcgtaatc gattttctga gtcaaatatt ttgtttcat attatttagg 60
gagttttca tatggacaat acataaaaa atatatgcag tgcaagttat tttgtttac 120
ttattcaatt tatccgttca atcccctaaa caaaatttta ccctaaacta tttatttgg 180
tccaatctac accctaatta tatttctctt tttatttctc tgtgtctgag ttaaatttg 240
acttcaaatt ttatgaatag atgcaaaaac tgatgcttta tgctaaaaat tttactaag 300

aaattttctt tgttatgttc atagggtcaag aatatttaaat atgaaattga tcttacatat 360
ataaaaactgt acaaaaaagta atcatgaaaa aaattaatat atttgttcta acatagagca 420
ttatgtataa gtcaactgac aaaatttgaa attaaaaactc agcttgcatg tgaagaaaca 480
aaaaaagaga aatctaatta ggggtagatt ggaccaaata aaatagtta agggggggta 540
aaatgagcca aattttgttc aaggggttaa gtggatcaag taaatagatg aggggggtaa 600
aatggacttt ttcaacaat taacctcatc tatagaaggg taggtgcac tcagttcgaa 660
aaataagatg catttggatc ttgaaaaatc aatttcccct cacaccccca aatggaaatt 720
gtcgtcacta ctcagataac taatgaaagt agactctat tgtgatgatc caaaaggtct 780
ctgtgattgg aatttcgtcc acactatttt cacaacatcg taatgagata taatattgtt 840
ccaccagaaa gcctacctgc atgggtcattt ctaataacca actcaaaaaa tggtaaata 900
catgctcttt tagtgaaaaa cttaaggaa cctagcttgc caaaatttat ctttgcatt 960
aacaactcag ttcaacat ccagttctca acaacttcac tttttttt gcgggtaaaa 1020
caacttcact ttacatgttg ccaaatgaa cacaacagtc acgtccatt gaggtaccta 1080
gcaactggg catccttctg ctcgtacctc tacatatatt tgcctctgat caacacaaca 1140
ttctaaacc catttcttg gcatttccc atgttacaag gcgcaaaaca accaaccat 1200
atggcaattt actaaactaa actatgctga tccaatgcag caatcttgat cgtagtact 1260
gtccagcatt acatctgaaa caagtccaga tcacccatct catcacagtc acatgcatcc 1320
atgggtcacgg gaaccgttaa cacacaccac caactaatcg gcattgtctc aatcctccta 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 tagtagcaaa 90

<210> 9

<211> 583

<212> ДНК

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

<400> 9

tctgtagat gcaacgagct ggaagccagg cctgggacaa ctcgttgatg ggcgtggggt 60
tcatcaaaaca gagattagct tatccattt tatgtagatg tgccatgtat gcatatgttt 120
tggaataatg gtgactcgtg aggaagcccg tgcacatgtt ttggaatgat ttctgccacc 180
gatcgagaaa ttcaaaataa ggcgagcaca tcagtgttct gttaaaataa taaacggtag 240
attgaaataa tgattccagc tagcactata tattgtattt ctacgttaat aattttatat 300
attgcataag ggtctccta attcatgcat cactagtagc tagcacgttg agtgtatttg 360
gcatgttttc tcaactgtct tcccctgtat cctgatcgat ctctcctca taactggcac 420
atcccaggac aaccaggcaa cgctcaaac acacatgcgt tgctgattat ccacgtgca 480
tgatgcacga agccaatcac taaagcatca cctccacac catcgttcag ctataaaaac 540
cctgccaac tgcgtgagag gaccatccca aagcacaaga gca 583

<210> 10

<211> 61

<212> ДНК

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

<400> 10

cgaagtgcag cactaaagca ccacttctg ctcacaccgt ttagtaata atccatcacc 60
a 61

<210> 11

<211> 1500

<212> ДНК

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

<400> 11

ttgtgagaca aaaacactgt tgcggctggg aataagccgg ctgataagtt caagcgaaca 60
ggctgtactt tagtgcttct attgaacca ttggttctca ctctggctat gcattgttg 120
atttcactc tggcttataa tttttctg cctagtaata gttttgaaa taatgggagc 180
aaccacttca gttataatat aatgtttgta tgttataatg ggagcaatca ctctggttaa 240
ttgttcctg ttataccat gcaggctgca ttatattaat tgcttagttc ctcttggtt 300
gtatgtgact atgagatttt tggacctct acaggaagtg aaggggaagag gattcctgct 360
ggtttcaaca gacatagcaa gcaaagggtt tgcttctctg attgtgtatc tagatcacag 420
tagtgtgaat gtgcaccaag caaaacttaa attaggtgct ctatccatgt acattaagcc 480
tagctgtatc aaaaaaatt cggtgttatc tgcgtaatat tggatgtata tataagattc 540

tggcattgga atttatattt ttttttgtt ttttaattcat tatcacagac gcggtgttgg 600
cgtgcgcgtc tgcataagg tgcgtcaca gacgcgttt gactatacgc gtctgtgata 660
gggttactac agacgcgtct ttactccacc agtctgtctt ataacctaat cgcagacgcg 720
tgtttgata acgcagacgc ttattggtaa cagcgcgtctg tagaagaaac ttattacaga 780
caggttatta agcgcgtctg tgatgtgtct taacacgcgt ctgtaagtgt gatttattac 840
atagtgatcg gcccatatga acgaatgatc gatctaggcc caaagttagt gtatgaaatg 900
ttcatttacc ttcaatgcg gtttctcaa aaaaaacgtt ccaatgctaa aaaaaacat 960
aggaattata tagtttgcg gtggcttagt aacttcgtcc aatcgtgcta gtttaattg 1020
tatatactg taccatgcta ttctctggc ctgggttctt gcgcatccat tattaatgac 1080
cagccacgc cagcattca ttctaatca ccagttgctt gacatccaat gtcctctcca 1140
ctacttgcgc acaccgtctg atactccaag atcccaagct aagataacac ccagtgatca 1200
tatataataa aacaaacgcc agtgcgagcc tggccatttg cggagccaac cgaagccgtg 1260
cacaaaatat tcgataccgt atcagggaaa aactagtta tacgaggtag gcaataatcc 1320
atgtttcaa aaaaacaggt aggcaataat ccagatcgga ctcttctaa cggggttcac 1380
atgcatatat gaatatgatg gccgggttca catgaacgct agatatctg cctagtagtg 1440
caccgatttc ttaatcccga ggctggacta taagtacccc tggaacacc gtgatcaaag 1500

<210> 12

<211> 98

<212> ДНК

<213> Miscanthus sinensis f. gracillimus

<400> 12

catcgcaaac aagctgctaa tcacttctca agagctctct aactacatta attagctaga 60
gtgatccgcg aggtagctgg ctgtgatcg agcaatac 98

<210> 13

<211> 740

<212> ДНК

<213> Tripsacum dactyloides

<400> 13

aaatggatga aacaacttgg accaatcaga gatggccacg tcagctcccg atcgtcgtaa 60
ccgaccaaac ccgatcgata acggtttagg ctccaatata ccgtcggtag caccgggtcg 120
ctatcatctg cccccgtccc aacgctattg gtatcgtccg cccctatac ggctcggtagc 180
ccagtcacc gtcggggcca atcgtcccct gctcgtccg ctctgtcgg taccgatcg 240
caaaaacgcc acgtcaacgg cactcgggta ccgaccgcg ctggcaccgg ccttagcggg 300
ccacacgacc gatcgtgtt gtacggacgt agaggatgaat catgcgattg aatttctgct 360
agaggaaagt tatcatctta ttatctcaa cctccttcc tacggctgga tccgacgaaa 420
atttaccctg gacggtgcc gtaacaattg caggtctcac tcacgtgcta aatccagcaa 480
tcaaacacga aggaatatac gtgatctggc cagaacatgc aagagaataa tacagtagtg 540
ttagagtacg aaacctacac gattcaacga attaatcaat gggttcacgt tcacgggtat 600
gtcgcgcac gtccaaaac caacgacatt ttataagcg gcatgatcca gacgggccag 660
ctcagacacc acatggcgtg gctccatctc gcatcccca tcaccgctat aaataccatt 720
ggccatgcac accgcactc 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 caaacaaaaa 60
atatctataa gtggccctag gtaagaaaa gtgccagtgg aaatgcatct ttattgacgg 120
tttcttgta tctattgcca gtaaaaaatca tatattaca ttggcgattc tttgaagcat 180
accgtcatga caaatctgat ttctattgac agaattgcta agagaatcgc tatttgtcat 240
ttagttgcag catttaattg gtatgttagt ctatgaaata gggaagtgga attttgatt 300
gagagatatt gtttcattct tagttttacg acaccttga tgatgtagca gcgctggaaa 360
gagtgttatg aaattcctat tgagaatagc cttacaggtc aacagcatac ttttaaaatt 420
aaaccagaga tataccaaac ttcagtttct acgatataat attttctac ctcataagtt 480
ataatcagtg gtacctcctt tttttatat cccttatta aggacggtag agaacgtcct 540

ctactcgtat gttgtacacc accggtaacg caattaagta aaacatgcat gtcaagtagt 600
aagtatataa gttggcaact caccagatgg caggagtcct gacccatcac cggctagcta 660
tagctctgt tacgtgaatt cagcatgatt gctcaacttg ctctgtatt tccacatggg 720
ggagaattgt catatctccc cctaacaact ggcgcgtcca gagacaacca tgcaatgacc 780
aaaccgatcg aatcacacat gctttgcagc attcatgtac caatgctgcc aagcacgaaa 840
gcatctccct ctccgctcca tccatcgtca gctataaaaa ccatgccaaag caccctgtga 900
aaa 903

<210> 16

<211> 69

<212> ДНК

<213> *Tripsacum dactyloides*

<400> 16

gcaccccaaa gcacacaaga gcacgcagtg cagcactcaa gcacttcctg ctactgcac 60
accgtacca 69

<210> 17

<211> 1500

<212> ДНК

<213> *Tripsacum dactyloides*

<400> 17

aaaaggcact ttctcaaga aacagagtta gagatcaaac caaagtgcta gaaacattgt 60
aataggtatg tgcaacatat taaagggtc aaacctcaca gttttaccct tttcacaaa 120
gttgcacttc ctggcctcgt ttaagcttat ttggacttag aatcttcaaa ttgtgctcga 180
ttgaaccttt actcatatac ttagcaaaaca agttagtcca agatgttggt ttggacattc 240
aatcaccaaa acttatggaa atggcctaat tgcccatttc ctttcatgg tacaattgt 300
ttcacagatt taagcagaag ctatatcaaa cacggcgctt ctacaacagc ttatcagttt 360
agttgcttct cagaatgaaa ggtaataaac ataagctgct ttactaga tccttagata 420
agttgctttt ttaacaagca gctctgcaa gcagggccat agtgccatgt ttaggctgg 480
tcgcttccc gagccatatg aaggctgctg gtccatgtgg ctgaaattaa agttgatagg 540
cccacggaa caaatggta attagaggcc caaaattgt gagtcaaatt ttcattaca 600
cttcacgct agtaaacgaa aacatatata gtacctatat atcgatttt ttttctggt 660
gtcttagaaa ctctgctcaa taatcatgct agttaatt gtatacctgc acaaagctat 720
tcctctggcc ttggtcttt gcgcgtccat gctgtttat ggatgattgc agccacgcca 780
cgcattcatt ctcaatcacc attgcttga catctaatt cctctgcacc acttgcgcac 840
gctacacacc gtctgatacg ccaggatccc aagctaaaat aacaccaat gatcatgtga 900
aaacaagtga cagtgcgagc cagcccatgc agcgatcttg gccatttgcg gagccaaccg 960
aagccgtgca caaaatattc gataccgtat aaggggaaac actagtata cgaggtaggc 1020
aaatataatc ctcttctaa ccggcggccg ggttcacatg catatatgat ggccgccagc 1080
cgggttcaca tgatgaacgc tatggtgcct agtgcacgat ttattaatct cccgaggctg 1140
tactataaat acatcggtta tactgtgatc aaagcatcgc aaagaagatc ttaagactg 1200
tctccagcaa cgctcttat atctatctc tatactgtc cttacagtc tccttaaaa 1260
gattccatcc tctatatctc ctctctcc aacaacggcc tctaaatcac gtctctata 1320
cgaaataacc tatattagag acatttttaa ttttaatt ttgtacata cgtatttgc 1380
atactctaa atgtattga catatttag ttgtctaaa ccggtgttt aaagtattca 1440
aatggataga ggagaggaga gagaaactct atatatagag gatccagcag cgtctctaa 1500

<210> 18

<211> 172

<212> ДНК

<213> *Tripsacum dactyloides*

<400> 18

atttagagga ccgttagag gacgctgctg gagggagtag aggacgacag cgttctctaa 60
aatttagagt acaggatact ttagaggacc tgctggaggc agtctaaca ctgcatttgg 120
ctagagagag tgatcgcgag gtacttagct ggcttgatg cgtcagagca aa 172

<210> 19

<211> 645

<212> ДНК

<213> *Saccharum officinarum*

<400> 19

caaattaaag ttgataggcc catcggaaga aatgatcaat gtaaggccca aaatttgtgt 60
ctgaaatgtt cgtttacatt ttaagctaa ataaaaacat aggaattata tagttttgct 120
ggtggcttag aaacttcgtc caaaatatta aaaaaaaga aaagaaactt cgtccaaaat 180
ggtgcttagt ttaatttga tactgcacc atgtattcc tctggccttg ttctttgctg 240
catctatcca tgctatgga tgatcgagc cacgccacgc aattcattct taatcaccat 300

ttgcttgaca tccaatgtcc tctacaccac cacttgcgca ccctacacac cggccatttg 360
 atacgccaaag atcccaagct gaaataacac ccaatgatca tatgaaaaca agcgtgagtg 420
 cgagcctgcc catgcagcga tcttgccat ttgcggagcc aaccgaagcc cgtgcacaaa 480
 atattcgaga cgtataagg gaaaacacta gttatagcga atgtccacaa taatccagat 540
 cgactcttc taaccgggtt cacatgaacg ctgttggtcc tagtgcaccg atttctaaa 600
 tcccaaggct cgactataaa taccctgtgt atttgcaccg tgatc 645
 <210> 20
 <211> 86
 <212> ДНК
 <213> Saccharum officinarum
 <400> 20
 aaagcatcgc aaacaagcta aagagctctc taactacatt gattagagtg atctgcgcta 60
 gaaggaggct agcttgtagt cgagca 86
 <210> 21
 <211> 1563
 <212> ДНК
 <213> Setaria italica
 <400> 21
 agaccagca acctaccgag ggggtacccg aggtagtgtt ttgtggtggg gctcgtcgaa 60
 gatcaggaac ttgaaggtag actcgaacac acgattaga caagttcggg ctgcttatgc 120
 cgcataatac cccatgtcat gtgtgtggt ttgattgtat tgattgatca gatatttga 180
 gggggccctg cctcgcctta tattgcccat tgccggaggg agggctacag gtcggtgtt 240
 gtacaagagt actagtcggt ttgaccagc gagtctact ctaattgcta caagtagtt 300
 cctaactctt gactagtcct tgcgcgccac gtagaccagc acgtcttgca cctagtctct 360
 gtgttgata catcttggtg tacagtccga tattgtagga ctatccaagc ttcccagtag 420
 gccatagat gtatggccga caactggata atgtaactct ggtcagtagc tatcctatc 480
 tatatagaca caaacaagct actatagcag aagttaagc tcgtaacca ccaatatttg 540
 gtggcataga ccacgtattg ctgatatagt gctcgaacc caccaatatt tctgtgcata 600
 gagatctctt aggcataaaa ttgacgtac gaaacaatct atgtccacgt gttgctaata 660
 caatgttcta aaccttacag cctactggac agttctctag ccatgataca tgtgcatgct 720
 cgaacaaata ttatgggta cccgaaaggt taatttttg tagtattat gagggggagg 780
 ggggctgtga cgaaaaaaat aacttagcta agcgtaatg gcttaaaaac atacaatgtt 840
 gttccagcat caagcctacg tgatcatttc acaaaaccaa ctcaaaagat aggtgtcatg 900
 ttcttttag tgcaaaactt aaggacacct acctgcaaa acttagcttt gttaccaga 960
 atgaaccgct aagctcgagg agctctgaac ttacatgacc aaatatatta aacacaaaag 1020
 tcatgcatga tttctttaa taagtatcga gcaatatggt tcgggtgtct ttcgtctcat 1080
 acctctattg tctccgtga tcaacaaggg tggatccggg tgggtcaagg gggctcaagc 1140
 cccctacct ctcccaaagg agaaagaagg gagaagaaag tgaaggaaga agaaaccccc 1200
 tatattctaa tgctacctcc gccactgctg atcaacacaa cattctaaa accatttct 1260
 tggcatttgc gcatgttaca aggtacaaaa gagccagccc atatgccaag ttactaaact 1320
 aaactatgat ccaccatgga gcgagaacaa acgtcaacag gcatcaacca atgcagcaat 1380
 ctgtagcgt agtactgtcc ggcattatat ctgaacaaa tccagatcac ccatctcatc 1440
 acagtcacat gcattcatgg tcacgggaac cgttagcaaa ccaccaacta atcagcattg 1500
 caacactctt cctctataa atgcagcgag cgggggacac cataaacat cacaggcact 1560
 tag 1563
 <210> 22
 <211> 67
 <212> ДНК
 <213> Setaria italica
 <400> 22
 cgatcaagtt aattttgtt ctgctttgtg cgcctgtgtt ccagtaatta cttccgtgt 60
 agcaaaa 67
 <210> 23
 <211> 1528
 <212> ДНК
 <213> Oryza sativa
 <400> 23
 ggaagctaac tagtcacggc gaatacatga cgacatcggc ctacaacgca caacttctt 60
 gcataaaagc ttcaatttca atgccctat ctggaagccc taggcgccgc gcaaatgtaa 120
 aacattcgct tcgcttggtt tttatccaa aatagagtat ggacctccga cagattggca 180
 acccggtggg aatcgaaaaa ggctccatct gccctttgt cgaaggaatc aggaacggc 240
 cctcacctcc tggcggagtg tagatatgtg aaagaatcta ggcgacact gcagactgga 300

caacatgtga acaaataaga ccaacgttat ggcaacaagc ctgcacgcta ctcaagtgg 360
gggagggccac cgcattgtcc aacgaagcgc caaagaaagc ctgcagact ctaatgctat 420
tagtcgccta gcatatttg aatgaaagga accgcagagt ttccagcac caagagcttc 480
cgggtggctag tctgatagcc aaaattaagg aggatgcca aacatgggtc ttggcgggcg 540
cgaaacacct tgataggtgg ctacctttt aacatgttcg ggccaaaggc ctgagacgg 600
taaagtttc tattgcgct tgcgcatgta caatttatt cctctattca atgaaattgg 660
tggctcactg gttcattaaa aaaaaaagaa tctagcctgt tcgggaagaa gaggatttta 720
ttcgtgagag agagagagag agagagagag agaggagag agaaggagga ggaggattt 780
caggcttcgc attgcccaac ctctgctct gttggccaa gaagaatccc aggcgccc 840
gggctggcag ttaccacgg acctacctag cctaccttag ctatctaagc gggccgacct 900
agtagctacg tgcctagtgt agattaaagt tggcgggcca gcaggaagcc acgctgcaat 960
ggcatcttc cctgtcctc gcgtacgtga aaacaaacc aggtaagctt agaattctt 1020
tgcccggttg actgggacac ccaccaatcc caccatgcc ccatattct cgggtctcg 1080
ttcatgtgat gtcctctct gtgtgatcac ggagcaagca ttctaaacg gcaaaagaaa 1140
atcaccaact tgctcacgca gtcacgctgc accgcgcgaa gcgacgccc ataggccaag 1200
atcgcgagat aaaataacaa ccaatgatca taaggaaaca agcccgcgat gtgtcgtgtg 1260
cagcaatctt ggtcattgc gggatcgagt gctcacggc taaccaaata ttcggccgat 1320
gattaacac attatcagcg tagatgtacg tacgattgt taattaatct acgagccttg 1380
ctagggcagg tgtctgcca gccaatccag atcgccctcg tatgcacgt cacatgatgg 1440
cagggcaggg ttacatgag cttaacggg cgattaatta atcccggggc tcgactataa 1500
atacctccct aatcccatga tcaaaacc 1528

<210> 24

<211> 99

<212> ДНК

<213> Oryza sativa

<400> 24

atctcaagca gcctaactcat ctccagctga tcaagagctc ttaattagct agctagtgt 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 cctctggggc 60
 ttctccctcg accgtgagaa ctgcggcatc gaccagcgct ggtgggagtc cgccctccag 120
 gagtctaggg ccatcgccgt gcccggttc ttcaacgacc agttcgccga cgccgacatc 180
 cgcaactacg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaggtgt tcatcccgaa gggctgggcg 240
 ggccacgcga tcgtgtccg cttcgacgcc gtgacccact acggcaaggt ctgggtgaac 300
 aatcaggagg taagtttctg ctctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta 360
 gtagtaatat aatatttcaa atatttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 420
 gcttttctg agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca 480
 aaattgttg atgtgcagggt gatggagcac cagggcggtt acaccccggt cgaggccgac 540
 gtgacgccgt acgtgatcgc cgggaagtcc gtccgcatca ccgtctgctg gaacaatgag 600
 ctgaactggc agaccatccc gcttgcatg gtcatcaccg acgagaacgg caagaagaag 660
 cagtcctact tccagcactt ctcaactac gctggcatcc accgtccgt gatgtctac 720
 accactcca acactgggt ggacgacatc accgtgttca cccacgtggc ccaggactgc 780
 aaccacgcct ccgtggactg gcaagtcgt gccaacggcg acgtcagcgt cgagctgcgc 840
 gacgcccagc agcaagtcgt tgcaccggc cagggcacca gggcacct ccaagtcgtc 900
 aacctcacc tctggcagcc tggcgaggc tacctctacg agctgtgcgt caccgccaag 960
 agccagactg agtgcgacat ctaccctctc cgcgtcggca tcaggagcgt cgctgtcaag 1020
 ggcgagcagt tctcatcaa ccacaagcct ttctacttca ctggttcg cgcacacgag 1080
 gacgtgacc tgaggggcaa gggtttcgac aacgtcctga tggtcacga ccacgctctg 1140
 atggactgga tcggtgcaa cagctacagg accagtcact acccgtagc tgaggagatg 1200
 ctggactggg ctgacgagca cggtatcgtc gtgatcgacg agactgctgc ggtcggttc 1260
 aacctgtctc tgggcattgg ttctgaggct gggaacaagc cgaaggagct gtactctgag 1320
 gaagctgtca acggcgagac tcagcaagct catctccagg cgattaagga gctgattgcc 1380
 agggacaaga accatccgtc tgtctgatg tggctattg cgaatgagcc ggacaccaga 1440
 ccgcaagggg cgcgtgaata ctctcgccg ctggcgagg cgactcgaa actggaccca 1500
 acccgccaa tcacgtcgt caatgtcatg ttctgcgacg cccatagga tacgatctcg 1560
 gacctgtcg atgtcttg tctcaatcg tactatgggt ggtatgtca gagcggggat 1620
 ctgagacgg cggagaaggt tctgagaag gaactcctgg cgtggcaaga gaagtcctat 1680
 cagccgatca ttacacgga gtacggggt gacacactg cgggccttca cagtatgtac 1740
 acagatatgt ggtcggagga atacagtg gcatggttg atatgtacca tcgtgtctc 1800
 gaccggggtt cagcggtgt cggcgaacaa gtctggaact tcgagactt cgccacgagc 1860
 caagggatac tgcgggtagg agggaacaag aagggaatct tcacacggga tcggaagccc 1920
 aagtcagcag cttcctgtt gcagaagcga tggacaggaa tgaacttcg 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 cctctggggc 60
 ttctccctcg accgtgagaa ctgcggcatc gaccagcgct ggtgggagtc cgccctccag 120
 gagtctaggg ccatcgccgt gcccggttc ttcaacgacc agttcgccga cgccgacatc 180
 cgcaactacg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaggtgt tcatcccgaa gggctgggcg 240

ggccagcgca tcgtgtccg cttcgacgcc gtgacccact acggcaaggt ctgggtgaac 300
aatcaggagg tgatggagca ccagggcggt tacaccccggt tcgaggccga cgtgacgccg 360
tacgtgatcg ccgggaagtc cgtccgcac accgtctgcg tgaacaatga gctgaactgg 420
cagaccatcc cgctggcat ggtcatcacc gacgagaacg gcaagaagaa gcagtcctac 480
ttccacgact tcttcaacta cgctggcatc caccgtccg tgatgtctta caccactccc 540
aacacctggg tggacgacat caccgtggc acccagtg cccaggactg caaccacgcc 600
tccgtggact ggcaagtcgt tgccaacggc gacgtcagcg tcgagctgcg cgacgccgac 660
cagcaagtcg ttgccaccgg ccagggcacc agcggcacc tccaagtcgt caaccctcac 720
ctctggcagc ctggcgaggg ctaccttac gagctgtgcg tcaccgcaa gagccagact 780
gagtgcgaca tctacctct ccgctgcggc atcaggagcg tcgctgtcaa gggcgagcag 840
ttctcatca accacaagcc ttctacttc actggttctg gccgccacga ggacgtgac 900
ctgaggggca agggtttca caacgtcctg atggtccacg accacgtct gatggactgg 960
atcggtgcca acagctacag gaccagtcac taccgtacg ctgaggagat gctggactgg 1020
gctgacgagc acggtatcgt cgtgatcgac gagactgctg cggtcggtt caacctgtct 1080
ctgggcattg gtttcgaggc tgggaacaag ccgaaggagc tgtacttga ggaagctgtc 1140
aacggcgaga ctacgaagc tcatctccag gcgattaagg agctgattgc cagggacaag 1200
aaccatccgt ctgtcgtgat gtgtctatt gcgaatgagc cggacaccag accgcaaggg 1260
gcgctgaat acttcgcgc gctggcggag gcgactcgca aactggaccc aaccgtcca 1320
atcacgtcg tcaatgtcat gttctgcgac gccatacgg atacgatctc ggacctgtc 1380
gatgttctt gtctcaatcg gtactatggg tggatgttc agagcgggga tcttgagacg 1440
gcggaagaag ttcttgagaa ggaactcctg gcgtggcaag agaagctcca tcagccgatc 1500
attatcacgg agtacggggg tgacacactt gcgggccttc acagtatgta cacagatatg 1560
tggtcggagg aataccagtg tgatgggtg gatagtacc atcgtgtctt cgaccgggtt 1620
tcagcgggtg tcggcgaaca agtctggaac ttcgacagc tcgccacgag ccaagggata 1680
ctgcgggtag gagggacaac gaagggaatc ttacacggg atcggaagcc caagtcagca 1740
gccttctgt tgcagaagcg atggacagga atgaacttcg gagaaaagcc acagcaaggc 1800
ggaaagcagt ga 1812

<210> 31

<211> 1812

<212> ДНК

<213> Escherichia coli

<400> 31

atgggtccgtc ctgtagaac cccaacccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60
ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttacaa 120
gaaagccggg caattgtgtt gccaggcagt tttaacgac agttcgccga tgcagatatt 180
cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240
ggccagcgta tcgtgtcgcg ttctgatcg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300
aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccg 360
tatgttattg ccgggaaaag tgtacgtatc accgtttgtg tgaacaacga actgaactgg 420
cagactatcc cgccgggaat ggtgattacc gacgaaaacg gcaagaaaaa gcagtcctac 480
ttccatgatt tcttcaacta tgccggaatc catcgacgcg taatgtctta caccacgccg 540
aacacctggg tggacgatat caccgtggg acgcatgctg cgcaagactg taaccacgcg 600
tctgttgact ggcagggtgt ggccaatgtt gatgtcagcg ttgaactgcg tgatgcggat 660
caacagggtg ttgcaactgg acaaggcact agcgggactt tgcaagtgtt gaatccgcac 720
ctctggcaac cgggtgaagg ttatctctat gaactgtgcg tcacagcaa aagccagaca 780
gagtgtgata tctaccgct tcgctcgcc atccggtcag tggcagtga gggcgaaacag 840
ttctgatta accacaaacc gttctactt actggcttg gtcgtcatga agatgcggac 900
ttgctgggca aaggattcga taactgtctg atggtgcacg accacgcatt aatggactgg 960
attggggcca actctaccg tacctcgcat taccctacg ctgaagagat gctcgactgg 1020
gcagatgaac atggcatcgt ggtgattgat gaaactgtc ctgtcggtt taacctctt 1080
ttaggcattg gtttcaagc gggcaacaag ccgaaagaac tgtacagcga agaggcagtc 1140
aacggggaaa ctacgaagc gcacttacag gcgattaag agctgatagc gcgtgacaaa 1200
aaccaccaa gcgtggtgat ttggagtatt gccaacgaac cggatacccg tccgaaggt 1260
gcacgggaat atttcgcgc actggcggaa gcaacgcgta aactcgaccc gacgcgtccg 1320
atcacctgcg tcaatgtaat gttctgcgac gctcacaccg ataccatcag cgatctctt 1380
gatgtgtgt gcctgaaccg ttattacgga tggatgtcc aaagcggcga ttggaaaacg 1440
gcagagaagg tactggaaaa agaactctg gcctggcagg agaaactgca tcagccgatt 1500
atcatcacgg aatacgcggt ggatacgta gccgggctgc actcaatgta caccgacatg 1560
tggagtgaag agtatcagt tgcatggctg gatagtatc accgcgtctt tgatcgcgtc 1620
agcgcgctg tcggtgaaca ggtatggaat ttgcccgatt ttgcgacctc gcaaggcata 1680
ttgcgcgttg gcggtacaa gaaagggatc ttactcgcg accgcaaacc gaagtcggcg 1740
gctttctgc tgcaaaaacg ctggactggc atgaacttcg gtgaaaaacc gcagcaggga 1800

ggcaacaat ga 1812
<210> 32
<211> 2001
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(2001)
<223> Химерна кодуєча послідовність, яка складається з нативної GUS-кодуєчої послідовності E. coli з інтроном, який вирізається.

<400> 32
atggtccgtc ctgtagaaac cccaaccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60
ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaag cgcgttaca 120
gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt ttaacgac agttcgccga tgcagatatt 180
cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240
ggccagcgta tcgtgctgcg ttctgatcg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300
aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgcacgccc 360
tatgttattg ccgggaaaag tgtacgtaag ttctgcttc tacctttgat atatatata 420
taattatcat taattagtag taatataata ttcaaatat tttttcaaa ataaaagaat 480
gtagtatata gcaattgctt ttctgtagt tataagtgtg tatatttaa ttataactt 540
tttaataata tgacaaaaat ttgttatgt gcaggatca ccgtttgtg gaacaacgaa 600
ctgaactggc agactatccc gccgggaatg gtgattaccg acgaaaacgg caagaaaaag 660
cagtcttact tccatgattt cttaactat gccggaatcc atcgacgct aatgctctac 720
accacgccga acactgggt ggacgatac accgtggtga cgcagtgcg gcaagactgt 780
aaccacgct ctgttgactg gcagggtgtg gccaatgtg atgtcagcgt tgaactgctg 840
gatgcggatc aacagggtgt tgcaactgga caaggcacta gcgggacttt gcaagtgtg 900
aatccgcacc tctggcaacc ggtgaaggt tatctctat aactgtgct cacagccaaa 960
agccagacag agtgtgatat ctaccgctt cgcgtcggca tccggtcagt ggcagtgaag 1020
ggcgaacagt tctgtattaa ccacaaaccg ttctacttta ctggcttgg tcgtcatgaa 1080
gatgcggact tgcgtggcaa aggattcgt aacgtgctga tgggtcacga ccacgcatta 1140
atggactgga ttggggccaa ctctaccgt acctcgatt acccttacgc tgaagagatg 1200
ctcactggg cagatgaaca tggcatcgtg gtgattgatg aaactgctg tgcggctt 1260
aacctctct taggcattgg ttccaagcg ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcgaa 1320
gaggcagtc acggggaaac tcagcaagcg cacttacagg cgattaaaga gctgatagcg 1380
cgtgacaaaa accaccaag cgtgtgtatg tggagtattg ccaacgaacc ggataccgt 1440
ccgcaagggt cagcggaata ttccgcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgaccg 1500
acgcgtccga tcactgcgt caatgtaatg ttctgcgacg ctacacccga taccatcagc 1560
gatctcttg atgtgctgt cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat 1620
ttgaaacgg cagagaaggt actggaaaaa gaactctgg cctggcagga gaaactgcat 1680
cagccgatta tcacaccga atacggcgtg gatacgtag ccgggctgca ctcaatgtac 1740
accgacatgt ggagtgaaga gtatcagtgt gcatggctgg atatgtatca ccgcgtctt 1800
gatcgctca gcgcgctgt cgggaacag gtatggaatt tcgccgatt tgcgacctg 1860
caaggcatat tgcgcgttg cggtaacaag aaagggatct tactcgca ccgcaaaccg 1920
aagtcggcgg ctttctgt gcaaaaacgc tggactggca tgaactcgg tgaaaaaccg 1980
cagcagggag gcaacaatg a 2001

<210> 33
<211> 435
<212> ДНК
<213> Setaria italica
<400> 33

ggcgccctt gagaagaagc tttgtctg ctgcgctat catgtttgt ggcttctgt 60
ttgtattct tgatctgcc ctgtctatc ttgtattgt actgtcctaa taagtggtag 120
ttgtagggtt attactgtgt ctggtattt acctagagga ggaattattg tctgctatt 180
ctggtttgc tgttatgta atggtgaacc aaagaatgaa gctgcaggct actttgagaa 240
ggaaggggac ctgctgctt ctactctgtc atgcgtgatt actgaacag tcctgatgat 300
ctattaatgt tctttggtca gtgcaagtgt ttggtgtagc tccaacagggt agtgtttatg 360
tttgtgaag cagcaatggc cgactgtatg ttttgtga 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 attatttacc ggcctgggtcc tggcaggatg agtgtagtag tgtacctaata 60
ttggtaggca atgggtttga gttaggccaa taaatgtgca gggttacatt tgggtgccat 120
gttagttcat aacttcatac 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 ccttaaactt ctctgtttgg taccagata aatacaaat cggtcgttgg 420
gtagaaaaac cgcctacgaa cactgggttc acctataag actactgcac tgttctagc 480
aggcttattt ttctctctgt tttttatatt ccaatgtata catattaatg ttatcgagc 540
tatgatctta taaatttga catgcttcaa tttttctaa aaactgaat aacagtatgt 600
aaaacctagg ttgatgttcc aaatgaactt attaacatt ttacgttgaa acagtacatc 660
gcgaatggca tattttttg ttgcatttat tctaaacacc taaaatgga attgaaaac 720
gggctctaag ttgagagaa gttaaggggt aatagtattc taaacacttc aagtttgaga 780
tccaaaataa ttaatctctc acctatcacc tccaatcaag ttgttatca gttatgcca 840
tgtacatgta tcgctgtgtt gttatttcac ctcatcttcg ctatgtatct actactattg 900
cgtaactctc aaatattaga tgacatgtaa actaaaatct ttggaaagat taataggata 960
cccgcgggtg ctgatatctg ttctaaaaa tgttgaatct aactatttgt aaatattgat 1020
atattttca gaaatgttgg attagtctt gtgaaatgtt gaaccgatat ctctgatatg 1080
gattaatgg gcttaaagct tccactagcc gtgtgcatgg gcgaaaaaaa atcttggcca 1140
agtgttactc cgtcgcggcc acacgccaca agtctctccg gccctcgtc gcccttacc 1200
ccatcgtacc cgcacacgg cgcgccacca gtggcgccgc ggtatgcgct catctcccgc 1260
gcggccacct cgcgcggtt agatttccct gggccccct cgcggtaccg tcatatatt 1320
ttggcgctc ttctctgcg cccctctct cccgaaccgc agataccacc gattcggcag 1380
ctgaacaaa gcaacaagca agtgatccc gaccgaccgt ctcggtacg cgctcactcc 1440
gcctctgccc ttgttactg ccacgtttct ctgaatgctc tctgtgtgg tgattgctga 1500
gagtgttta gctggatcta gaattacact ctgaaatcgt gttctgcctg tgctgattac 1560
ttgccgtcct ttgtacgagc aaaatatagg gacatgtag tacgaaacga agatagaacc 1620
tacacagcaa tacgagaaat gtgtaatttg gtgcttagcg gtatttatt aagcacatgt 1680
tgggtgtata gggcacttgg attcagaagt ttgctgttaa tttaggcaca ggcttcatac 1740
tacatgggtc aatagtatag ggattcatat tataggcgat actataataa ttgttcgtc 1800
tgacagagctt attatttgc aaaattagat attcctattc tgttttgtt tgtgtgctgt 1860
taaattgtta acgcctgaag gaataaatat aaatgacgaa atttgatgt ttatctctgc 1920
tcctttattg tgaccataag tcaagatcag atgcacttgt tttaaattt gttgtctgaa 1980
gaaataagta ctgacagat ttgatgcat tgatctgctt gttgttgta acaaaattta 2040
aaaataaaga gtttctttt ttgtgtctc ctacctctc gatggtatct agtatctacc 2100
aactgacact atattgttc tcttacata cgtatcttgc tcatgcctt ctccctagt 2160
ttgaccagtg ttactacat agtctttgct 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 attatttacc ggcctgggtcc tggcaggatg agtgtagtag tgtacctaata 60
ttggtaggca atgggtttga gttaggccaa taaatgtgca gggttacatt tgggtgccat 120
gttagttcat aacttcatac 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 ccttaaactt ctctgtttgg taccagata aatacaaat cggtcgttgg 420
gtagaaaaac cgcctacgaa cactgggttc acctataag actactgcac tgttctagc 480
aggcttattt ttctctctgt tttttatatt ccaatgtata catattaatg ttatcgagc 540
tatgatctta taaatttga catgcttcaa tttttctaa aaactgaat aacagtatgt 600
aaaacctagg ttgatgttcc aaatgaactt attaacatt ttacgttgaa acagtacatc 660

gcgaatggca tattattttg ttgcatttat tctaaacacc ttaaaatgga atttgaaaac 720
 gggctctaag ttgagagaa gtttaagggg aatagtattc taaacacttc aagtttgaga 780
 tccaaaataa ttaatctctc acctatcacc tccaatcaag ttgttatca gtttatgcca 840
 tgtacatgta tcgctgtgtt gttatttcac ctcatcttcg ctatgtatct actactattg 900
 cgctaactc aaatattaga tgacatgtaa actaaaatct ttggaagat taataggata 960
 cccgcgggtg ctgatatctg ttctaaaaa tgtgaatct aactattgt aaatattgat 1020
 atattttca gaaatgttg attagtctt gtgaaatgtt gaaccgatat ctctgatatg 1080
 gatttaatgg gcttaaaagt tccactagcc gtgtgcatgg gcgaaaaaaa atcttgcca 1140
 agtgttactc cgtcgcgccc acacgccaca agtcctcccg gccctcgctc gcccttacc 1200
 ccatcgtacc cgccacacgg cgcgccacca gtggcgccgc ggatgcgcct catctcccg 1260
 gcggccacct cgcgcgggtt agatttcctt gggccccctt cgcggtaccg tcacatattt 1320
 ttggcgctc ttctctgcg cccctctctt cccgaaccgc agataccacc gagtcggcag 1380
 ctgaacacaa gcaacaagca agtgatcccg gaccggaccg accgtctcg gtacgcgctc 1440
 actccgcctt ctgccttgt tactgccacg ttctctgaa tgctctcttg tttggtgatt 1500
 gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt acactctgaa atcgtgttct gcctgtgctg 1560
 attacttgc gtccttcta gcagcaaaat atagggacat ggtagtacga aacgaagata 1620
 gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttggtgct tagcgggtatt tatttaagca 1680
 catgttggtg ttatagggca ctggattca gaagttgct gtaatttag gcacaggctt 1740
 catactacat gggtaaatag tatagggtt catattatag gcgatactat aataattgt 1800
 tcgtctgcag agcttattat ttgcaaaaat tagatattcc tattctgtt ttgttgtgt 1860
 gctgttaa atgttaacgcc tgaaggaata aatataaatg acgaaattt gatgtttatc 1920
 tctgctcctt tattgtgacc ataagtaag atcagatgca ctgttttaa atattgtgt 1980
 ctgaagaa atagtactgac agtatttga tgcattgac tgctgtttg ttgtaacaaa 2040
 atttaaaa ataaagattt ctcttctt ctctcttac ctctgatg tatctagat 2100
 ctaccaactg acactatatt gcttctctt acatacgtat ctgtctgat gccttctcc 2160
 tagtgtgac cagtgttact cacatagtct ttgctcatt cattgtaag 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 agactttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc 60
 ccagctatct gtcactttat tgtaagata ttggaagg aaggtggctc ctacaaatgc 120
 catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tggcccaaa 180
 gatggacccc caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgtccaac cagctctca 240
 aagcaagtgg attgatgtga tggccgatt gagactttc acaaagggtt aatatccgga 300
 aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgcacttta ttgtaagat agtggaaaag 360
 gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420
 tctgccgaca gtggcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 480
 gacgttcaa ccacgtctc aaagcaagtg gattgatgtg atcggaagct aactagtcac 540
 ggcgaataca tgacgacatc ggcttacaac gcacaacttc ttggcataaa agcttcaatt 600
 tcaatgcccc tatctggaag ccctaggcgc cgcgcaaatg taaaacattc gcttcgcttg 660
 gcttgtatc caaaatagag tatggacctc gcacagattg gcaaccctg ggtaatcgaa 720
 aatggctcca tctgccctt tgcgaagga atcaggaaac ggcctcacc tctggcgga 780
 gtgtagatat tgaaagaat ctaggcgaca ctgcagact ggacaacatg tgaacaaata 840
 agaccaactg tatggcaaca agcctcgacg ctactcaagt ggtgggaggc caccgcatgt 900
 tccaacgaag cgccaaagaa agccttgcag actctaagc tattagtcgc ctaggatatt 960
 tggaaatgaaa ggaaccgcag agttttcag caccaagagc ttccgggtgg tagtctgata 1020
 gccaaaatta aggaggatgc caaaacatgg gtcttgccgg gcgcgaaaca cttgatagg 1080
 tggctacct ttaacatgt tcggggcaaa ggccttgaga cggtaaagt ttctatttgc 1140
 gcttgcgcat gtacaattt attcctctat tcaatgaaat tgggtgctca ctggttcatt 1200
 aaaaaaaaaa gaatttagcc ttttcgggaa gaagaggatt ttattcgtga gagagagaga 1260
 gagagagaga gagagagga gagagaagga ggaggaggat tttaggctt cgcattgccc 1320
 aacctctgct tctgttgccc caagaagaat cccaggcgcc catgggctgg cagttacca 1380
 cggacctacc tagcctacct tagctatcta agcggggcca cctagtagct acgtgcctag 1440
 tgtagattaa agttggcggg ccagcaggaa gccacgctgc aatggcatct tccctgtcc 1500

ttcgcgtacg tgaaaacaaa cccaggtgaag cttagaatct tcttccccgt tggactggga 1560
caccaccaa tcccaccatg ccccgatatt cctccggctc cggttcatgt gatgtcctct 1620
cttggtgat caccgagcaa gcattcttaa acggcaaaaag aaaatcacca acttgctcac 1680
gcagtcacgc tgcaccgcg cgaagcgacgc ccgataggcc aagatcgca gataaaataa 1740
caaccaatga tcataaggaa acaagcccgc gatgtgtcgt gtgcagcaat ctggtcatt 1800
tgcgggatcg agtgttcac ggtaaccaa atattcgcc gatgattaa cacattatca 1860
gcgtagatgt acgtacgatt tgttaattaa tctacgagcc ttgtagggc aggtgttctg 1920
ccagccaatc cagatcgccc tcgtatgcac gtcacatga tggcagggca gggttcacat 1980
gagcttaac ggtcgattaa ttaatcccg ggctcgacta taaatacct cctaattcca 2040
tgatcaaac catcgaagc agcctaata tctccagctg atcaagagct ctaattagc 2100
tagctagtga ttgctgcgc ttgtatcga tcgatctcgg gtacgtagca cggaccggac 2160
cgaccgtct cggtagcggc tactccgcc cctgccttt gttactgcca cgtttctctg 2220
aatgtctct tgtgtggta ttgtgagag tggtttagct ggatctagaa ttacactctg 2280
aaatcgtgt ctgcctgtgc tgattactg ccgtccttg tagcagcaa atatagggac 2340
atggtagtac gaaacgaaga tagaacctac acagcaatac gagaaatgtg taattgggtg 2400
cttagcgga ttatttaag cacatgttg tttataggg cactggatt cagaagttg 2460
ctgttaatt aggcacaggc tcatactac atgggtcaat agtataggga tcatattat 2520
aggcgatact ataataatt gtctgtctgc agagcttatt attgccaaa attagatatt 2580
cctattctgt tttgttgtg gtgctgttaa atgttaacg cctgaaggaa taaatataa 2640
tgacgaaatt ttgatgtta tctctgtcc ttattgtga ccataagtca agatcagatg 2700
cactgtttt aaatattgt gtctgaagaa ataagtactg acagatttt gatgcattga 2760
tctgttgtt tgttgaaca aaatttaaaa ataaagagt tcttttgtg tgctctcct 2820
acctctgat ggtatctagt atctaccaac tgacactata ttgcttctt ttacatactg 2880
atctgtctg atgccttct ctagtgttg accagtgtta ctacatagt cttgtctcat 2940
ttcattgtaa tgcagatacc aagcgg 2966

<210> 37

<211> 2005

<212> ДНК

<213> Zea mays subsp. mexicana

<400> 37

gtcgtgccct tcttagaga taaagagcat tgcattgcta aagtataaaa aattaccaca 60
tattttttg tcacacttat ttgaagtga gttatctat ctctatacat atatttaaac 120
ttcactctac aaataataa gtctataata ctaaaataat attagtgtt tagaggatca 180
tataaataaa ctgctagaca tggctaaag gataattgaa tatttgaca atctacagt 240
ttatctttt agtgtgcatg tgatctctt gttttttg caaatagctt gacctatata 300
atactcatc cattttatg gtacatccat ttaggattta gggttgatgg ttctataga 360
ctaatttta gtacatccat ttattcttt ttagtctta aatttttaa aactaaaact 420
ctattttagt tttttatga ataattaga tataaaatga aataaaataa attgactaca 480
aataaaacaa ataccctta agaaataaaa aaactaagca aacattttc ttgttcgag 540
tagataatga caggctgttc aacgccgtcg acgagtctaa cggacaccaa ccagcgaacc 600
agcagcgctg cgtcgggcca agcgaagcag acggcacggc atctcttag ctgcctctg 660
acctctctg agagtccgc tccaccgtg gactgtctc gctgtcggca tccagaaatt 720
gctgtggcga gcggcagacg ttaggcggca cggcagggcg cctctctc ctctacggc 780
accggcagct acgggggatt ccttccac cgctcctcg cttcccttc ctgcccgc 840
gtaataaata gacacccct ccacaccctc ttcccaaac ctggtgtcg ttcggagcgc 900
acacacacgc aaccagatct ccccaaac cagccgtcg cacctccgt tcaaggtagc 960
ccgtcatcc tccccccc cctctctta cttctctag atcggcgatc cgtccatgg 1020
ttaggccccg gtattctac ttctgtcat gtttgtta gagcaaact gttcatgtc 1080
atgtttgtg tgatgtgtc tggttggcg gtcgttctag atcggagtag gatactgtt 1140
caagctacct ggtgattta ttaatttgt atctgtatgt gtgtgccata catctcata 1200
gttacgagt taagatgatg gatgaaata tcgatctagg ataggatac atgttgatgc 1260
gggtttact gatgcatata cagagatgct ttttctcg ctggtgtg atgatagg 1320
ctggtgggc ggtcgttcta gatcgagta gaatactgt tcaaactacc tgggtgatt 1380
attaaaggat aaaggtcgt tctagatcg agtagaatac tgttcaaac tacctggtg 1440
attattaaa ggaatctgt atgtgtcct acatctcat agttacgagt ttaagatgat 1500
ggatggaaat atcgatctag gataggata catgttgatg cgggtttac tgatgcatat 1560
acagagatgc tttttcgc ttggtgtga tgatgtgtc tgggtggcg gtcgttctag 1620
atcggagtag aatactgtt caaactacct ggtgattta ttaatttgt atcttatgt 1680
gtgtgccata catctcata gttacgagt taagatgatg gatgaaata ttgatctagg 1740
ataggatac atgttgatg ggttttact gatgcatata catgatggca tatcgggcat 1800
ctattcatat gctctaact tgagtacct tctattataa taaacaagta tgtttataa 1860
ttatttgat ctgatatac ttgatgatg gcatatgcag cagctatag tggattttt 1920

agccctgcct tcatacgcta ttatttgcgt tggactgtt tctttgtcc gatgtcacc 1980

ctgtgttgg gtgatacttc tgcag 2005

<210> 38

<211> 804

<212> ДНК

<213> *Oryza sativa*

<400> 38

accgtcttcg gtacgcgctc actccgccct ctgccttgt tactgccacg ttctctgaa 60
tgctctcttg tgtgggtgatt gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt acactctgaa 120
atcgtgttct gcctgtgctg attacttgcc gtcctttgta gcagcaaaat ataggacat 180
ggtagtacga aacgaagata gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttgggtct 240
tagcgggtatt tatttaagca catgttgggtg ttatagggca ctgggattca gaagtttgct 300
gttaatttag gcacaggctt cactactacat gggtaaatag tatagggatt catattatag 360
gcgatactat aataattgt tcgtctgcag agcttattat ttgcaaaaat tagatattcc 420
tattctgttt ttgtttgtg gctgttaaat tgtaacgcc tgaaggaata aatataaatg 480
acgaaatgtt gatgtttatc tctgtcctt tattgtgacc ataagtcaag atcagatgca 540
ctgttttaa atattgtgt ctgaagaaat aagtactgac agtatttga tgcattgatc 600
tgctgtttg ttgaacaaa atttaaaaat aaagagtttc cttttgtg ctctccttac 660
ctcctgatgg tatctagtat ctaccaactg acatatatt gcttctctt acatacgtat 720
cttgctcgat gccttctccc tagtgtgac cagtgttact cacatagtct ttgctcatt 780
cattgtaatg cagataccaa gcgg 804

<210> 39

<211> 253

<212> ДНК

<213> *Agrobacterium tumefaciens*

<400> 39

gatcgtcaa acattggca ataaagtgc ttaagattga atcctgttc cggcttgcg 60
atgattatca tataatttct gttgaattac gtaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
atgacgttat ttatgagatg ggttttatg attagagtc cgcaattata catttaatac 180
gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatc 240
atgttactag atc 253

<210> 40

<211> 300

<212> ДНК

<213> *Oryza sativa*

<400> 40

attaatcgat cctccgatcc ctaattacc ataccattac accatgcac aatatccata 60
tatatataaa ccttttcgca cgtactata ctatgtttg tcatacatat atatgtgctg 120
aacgatcgat ctactactga tatgatatga ttgatccac agcctgatct ctgtatcttg 180
ttattgtat accgtcaaat aaaagttct tccactgtg ttaataatta gctactctca 240
tctcatgaac cctatatata actagttaa ttgctgtca 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 acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc 60
ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtgaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc 120
catcattgcg ataaaggaaa ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tgggtccaaa 180
gatggacccc caccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca 240
aagcaagtgg attgatgtga tgggtccgatt gagactttc acaaaagggg aatatccgga 300
aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag 360
gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420
tctgccgaca gtgggtccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 480
gacgttcaa ccacgtctc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg 540
gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttct ctatataagg aagttcattt 600
catttggaga ggacacgctg acaagctgac tctagcagat ctaccgtctt cggtacgcgc 660

tcactccgcc ctctgccttt gttactgcca cgtttctctg aatgctctct tgtgtggtga 720
 ttgctgagag tggtttagct ggatctagaa ttacactctg aaatcgtgtt ctgcctgtgc 780
 tgattacttg ccgtcctttg tagcagcaaa atatagggac atggtagtag gaaacgaaga 840
 tagaacctac acagcaatac gagaaatgtg taatttggtg cttagcggtg ttatttaag 900
 cacatgttgg tgttataggg cacttggatt cagaagtttg ctgttaattt aggcacaggc 960
 ttcatctac atgggtcaat agtataggga ttcatattat aggcgatact ataataattt 1020
 gttcgtctgc agagcttatt atttgcaaa attagatatt cctattctgt tttgtttgt 1080
 gtgctgttaa attgttaacg cctgaaggaa taaatataaa tgacgaaatt ttgatgtta 1140
 tctctgctcc ttattgtga ccataagtca agatcagatg cactgtttt aaatattgtt 1200
 gtctgaagaa ataagtagtg acagtatttt gatgcattga tctgctgtt tttgtgaaca 1260
 aaatttaaaa ataaagagtt tcctttttg tgctctcctt acctcctgat ggtatctagt 1320
 atctaccaac tgacactata ttgcttctct ttacatacgt atcttgctcg atgccttctc 1380
 cctagtgttg accagtgtta ctacatagtg ctttgctcat ttcattgtaa tgcagatacc 1440
 aagcgg 1446
 <210> 42
 <211> 1653
 <212> ДНК
 <213> Photinus pyralis
 <400> 42
 atggaagacg caaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agaggatgga 60
 accgtgag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tggacaatt 120
 gcttttacag atgcacatat cgagggtgaac atcacgtacg cggaatactt cgaatgtcc 180
 gttcgggttg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgtg 240
 tgcagtgaat actctctca attctttatg ccggtgttgg gcgctgttatt tctcggagt 300
 gcagttgcgc ccgcaacga cattataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgaacatt 360
 tcgcagccta ccgtagtgtt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaattt gaacgtgcaa 420
 aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaacgga ttaccaggga 480
 ttcatcga tgtacagtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatacgt 540
 ttgtaccag agtctttga tctgtacaaa acaattgcac tgataatgaa ttctctgga 600
 tctactgggt tacttaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt cagattctcg 660
 catgccagag atcctatttt tggcaatcaa atcattccgg atactgcgt ttaagtgtt 720
 gttccattcc atcacgtttt tggaaatttt actacactcg gatattgat atgtggattt 780
 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcaggattac 840
 aaaattcaaa gtgcgttct agtaccaccc ctattttcat tcttcgcaa aagcactctg 900
 attgacaaat acgatttatt taatttacac gaaattgctt ctggggggcg accttttcg 960
 aaagaagtcg gggaagcgtt tgcaaaacgc ttcatcttc cagggtatcg acaaggatat 1020
 gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg agggggatga taaaccgggc 1080
 gcggtcggta aagttgttcc atttttgaa gcgaaggttg tggatctgga taccgggaaa 1140
 acgctgggag ttaacagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatgtccgtt 1200
 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct 1260
 ggagacatag ctactggga cgaagacgaa cacttctca tagttgaccg cttgaagtct 1320
 ttaattaaat acaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaaatgat attgttaca 1380
 caccacaaca tctcgacgc gggcgtggca ggtcttccc acgatgacgc cggtgaaatt 1440
 cccgccggcg ttgtgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat 1500
 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgt gttgtggac 1560
 gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatcctcata 1620
 aaggccaaga agggcggaat gtccaaattg taa 1653
 <210> 43
 <211> 936
 <212> ДНК
 <213> Renilla reniformis
 <400> 43
 atggcttcca aggtgtacga ccccgagcaa cgcaaacgca tgatcactgg gcctcagtg 60
 tgggctcgt gcaagcaaat gaacgtgtg gactccttca tcaactacta tgattccgag 120
 aagcacgccg agaagccgt gattttctg catggtaacg ctgcctccag ctacctgtgg 180
 aggcacgtcg tgcctcacat cgagcccggt gctagatgca tcatccctga tctgatcgga 240
 atgggttaagt ccggcaagag cggaatggc tcatatcgcc tcttgatca ctacaagtag 300
 ctacacgctt ggttcgagct gctgaacctt ccaagaaaa tcatctttgt gggccacgac 360
 tggggggctt gctggcctt tcaactactc tacgagcacc aagacaagat caaggccatc 420
 gtccatgctg agagtgtcgt ggacgtgatc gactcctggg acgagtggcc tgacatcgag 480
 gaggatatcg ccctgatcaa gagcgaagag ggcgagaaaa tgggtcttga gaataactc 540
 ttcgtcgaga ccatgctccc aagcaagatc atgcggaaac tggagcctga ggagttcgt 600

gcctacctgg agccattcaa ggagaagggc gaggttagac ggcctaccct ctctggcct 660
 cgcgagatcc ctctcgtaa gggaggcaag cccgacgtcg tccagattgt ccgaactac 720
 aacgcctacc ttcgggccag cgacgatctg ctaaatgtg tcatcgagtc cgaccctggg 780
 ttctttcca acgctattgt cgagggagct aagaagttcc ctaacaccga gttcgtgaag 840
 gtgaagggcc tccattcag ccaggaggac gctccagatg aatatggtaa gtacatcaag 900
 agcttcgtgg agcgcgtgct gaagaacagag 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
 ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctctcg gattccattg 60
 cccagctatc tgcacttta ttgtgaagat agtggaagaa gaaggtggct cctacaaatg 120
 ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtgtcccaa 180
 agatggaccs ccaccsacga ggagcatcgt gaaaaaagaa gacgttcaa ccacgtcttc 240
 aaagcaagtg gattgatgtg atgtgccgat gtgagacttt tacaacaaagg gtaatatccg 300
 gaaacctctc cgattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 360
 aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 420
 cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccccaccac gaggagcatc gtggaaaaag 480
 aagacgttcc aaccacgtct taaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 540
 gggatgacgc acaatcccac tatcttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat 600
 ttcatttga gaggaacct ctccacaca ctaagccac actattggag aacacacagg 660
 gacaacacac cataa 675

CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	ATGGTGAGGCCCGTTGAGACCCGACTAGGGAGATCAAGAAGCTGGACGGCCTCTGGGCC
CR-Ec.uidA-1:1:4	ATGGTCCGTCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCA
	***** *
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	TTCTCCCTCGACCGTGAAGTTCGCGGATCGACCGAGCTGGTGGGAGTCCGCCCTCCAG
CR-Ec.uidA-1:1:4	TTCACTCTGGATCGCGAAACTCTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAA
	*** *
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	GAGTCTAGGGCCATCGCCGTGCCCGGTTCCTTCAACGACCAAGTTCGCCGACGCCGACATC
CR-Ec.uidA-1:1:4	GAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGTTTAAACGATCAGTTCGCCGATGCAGATATT
	** *
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	CGCAACTACGCGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGAGGTGTTTCATCCCGAAGGGCTGGGCG
CR-Ec.uidA-1:1:4	CGTAATTATGCGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGAAGTCTTATACCGAAGGTGGGCA
	** *
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	GGCCAGCGCATCGTCTCCGCTTCGACGCCGTGACCCACTACGGCAAGGTCTGGGTGAAC
CR-Ec.uidA-1:1:4	GGCCAGCGTATCGTGTGCGTTTCGATGCGGTCACCTCATACGGCAAGGTGGGTCAAT
	***** *
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	AATCAGGAGGTGATGGAGCACCAGGGCGGTTACACCCCGTTCGAGGCCGAGTGACGCCG
CR-Ec.uidA-1:1:4	AATCAGGAAGTGATGGAGCATCAGGGCGGCTATACGCCATTTGAAGCCGATGTCACGCCG
	***** *
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	TACGTGATCGCGGGAAGTCCGTCCGCATCACCGTCTGCGTGAACAATGAGCTGAAGTGG
CR-Ec.uidA-1:1:4	TATGTTATTGCCGGGAAAAGTGTACGTATCACCGTTTGTGTGAACAACGAAGTGAAGTGG
	** *
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	CAGACCATCCCGCCTGGCATGGTTCATCACCGACGAGAACGGCAAGAAGAGCAGTCTTAC
CR-Ec.uidA-1:1:4	CAGACTATCCCGCCGGGAATGGTGATTACCGACGAAACGGCAAGAAAAAGCAGTCTTAC
	***** *
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	TTCCACGACTTCTTCAACTACGCTGGCATCCACCGCTCCGTGATGCTCTACACCACTCCC
CR-Ec.uidA-1:1:4	TTCCATGATTCTTTAACTATGCCGGAATCCATCGCAGCGTAATGCTCTACACCACTCCC
	***** *
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	AACACCTGGGTGGACGACATCACCGTGGTCAACCCACGTGGCCAGGACTGCAACACGCC
CR-Ec.uidA-1:1:4	AACACCTGGGTGGACGATATCACCGTGGTCAACCCACGTGGCCAGGACTGTAACACGCC
	***** *
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1	TCCGTGGACTGGCAAGTCTGTTGCCAACGGCGACGTGAGCTGAGCTGCGCGACGCCGAC
CR-Ec.uidA-1:1:4	TCTGTTGACTGGCAGGTGGTGGCCAATGGTGATGTCAGCGTTGAAGTGGCTGATGCCGAT
	** *

Фиг. 1a

```

CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CAGCAAGTCGTTGCCACCGGCCAGGGCACCAGCGGCACCCTCCAAGTCGTCAACCCTCAC
CR-Ec.uidA-1:1:4 CAACAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCACTAGCGGGACTTTGCAAGTGGTGAATCCGCAC
** ** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTCTGGCAGCCTGGCGAGGGCTACCTCTACGAGCTGTGCGTCACCGCCAAGAGCCAGACT
CR-Ec.uidA-1:1:4 CTCTGGCAACCGGGTGAAGGTATCTCTATGAACTGTGCGTCACAGCCAAAAGCCAGACA
***** ** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GAGTGCAGACATCTACCCTCTCCGCGTCGGCATCAGGAGCGTCGCTGTCAAGGGCGAGCAG
CR-Ec.uidA-1:1:4 GAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAG
***** ** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TTCCTCATCAACCACAAGCCTTTCTACTTCACTGGTTTCGGCCGCCACGAGGACGCTGAC
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTCCTGATTAACCACAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCGGAC
***** ** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTGAGGGGCAAGGGTTTCGACAACGTCCTGATGGTCCACGACCACGCTCTGATGGACTGG
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTGCGTGGCAAAGGATTTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGG
** * ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 ATCGGTGCCAACAGCTACAGGACCAGTCACTACCCGTACGCTGAGGAGATGCTGGACTGG
CR-Ec.uidA-1:1:4 ATTGGGGCCAACCTCCTACCGTACCTCGCATTACCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGG
** * ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCTGACGAGCACGGTATCGTGTGATCGACGAGACTGCTGCGGTGCGTTTCAACCTGTCT
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCAGATGAACATGGCATCGTGGTGATGTGATGAAACTGCTGCTGTGCGCTTTAACCCTCTCT
** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 CTGGGCATTGGTTTCGAGGCTGGGAACAAGCCGAAGGAGCTGTACTCTGAGGAAGCTGTC
CR-Ec.uidA-1:1:4 TTAGGCATTGGTTTCGAAGCGGGCAACAAGCCGAAGAACTGTACAGCGAAGAGGCAGTC
* ** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 AACGCGGAGACTCAGCAAGCTCATCTCCAGGCGATTAAGGAGCTGATTGCCAGGGACAAG
CR-Ec.uidA-1:1:4 AACGGGGAACCTCAGCAAGCGCACTTACAGGCGATTAAAGAGCTGATAGCCGCTGACAAA
***** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 AACCATCCGCTCTGTGCTGATGTGGTCTATTGCGAATGAGCCGGACACCAGACCGCAAGGG
CR-Ec.uidA-1:1:4 AACCACCCAAGCGTGGTGTGATGTGGAGTATTGCCAACGAACCGGATACCCGTCCGCAAGGT
***** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCGCGTGAATACTTCGCGCCGCTGGCGGAGGCGACTCGCAAACCTGGACCCAACCGTCCA
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCACGGGAATATTTGCGGCCACTGGCGGAAGCAACGCGTAAACTCGACCCGACGCGTCCG
** ** **

```

Фиг. 1b

```

CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 ATCACGTGCGTCAATGTCTGTCTGCGACGCCCATACGGATACGATCTCGGACCTGTTCT
CR-Ec.uidA-1:1:4 ATCACCTGCGTCAATGTAATGTCTGCGACGCTCACACCGATACCATCAGCGATCTCTTT
***** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GATGTTCTTTGTCTCAATCGGTACTATGGGTGGTATGTTTCAAGCGGGGATCTTGAGACG
CR-Ec.uidA-1:1:4 GATGTGCTGTGCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCAAAGCGGCGATTTGGAACG
***** ** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GCGGAGAAGGTTCTTGAGAAGGAACTCCTGGCGTGGCAAGAGAAGCTCCATCAGCCGATC
CR-Ec.uidA-1:1:4 GCAGAGAAGGTAAGTGGAAAAAGAACTTCTGGCCTGGCAGGAGAACTGCATCAGCCGATT
** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 ATTATCACGGAGTACGGGGTGTACACACTTGGCGGCCTTCACAGTATGTACACAGATATG
CR-Ec.uidA-1:1:4 ATCATCACCGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACTCAATGTACACCGACATG
** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TGGTCGGAGGAATACCACTGTGCATGGTTGGATATGTACCATCGTGTCTTCGACCGGGTT
CR-Ec.uidA-1:1:4 TGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGCATGGCTGGATATGTATCACCAGGCTCTTTGATCGCGTC
*** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 TCAGCGGTTGTGCGCGAACAAGTCTGGAACCTTCGCAGACTTCGCCACGAGCCAAGGGATA
CR-Ec.uidA-1:1:4 AGCGCCGTCGTCGGTGAACAGGTATGGAATTTGCCGATTTTGCGACCTCGCAAGGCATA
** ** **
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 GCTTTTCTGCTGCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTGAAAACCGCAGCAGGGA
** ** **
CR-Ec.uidA_nno-1:1:1 GGAAAGCAGTGA
CR-Ec.uidA-1:1:4 GGCAACAATGA
** ** **

```

Фиг. 1c