



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114481** (13) **C2**
(51) МПК
C12Q 1/68 (2006.01)

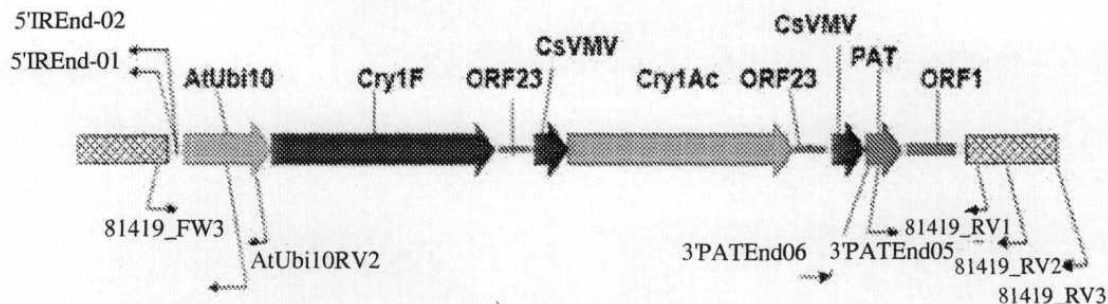
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 01816	(72) Винахідник(и):	Кларк Лорен (US), Сміт Келлі Енн (US), Ван Ян (US), Чжоу Нін (US)
(22) Дата подання заявки:	26.07.2012	(73) Власник(и):	ДАУ АГРОСАЄНСИЗ ЕЛЕЛСІ, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	26.06.2017	(74) Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/511,658	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 2007/0143876 A1, 21.06.2007 US 2007/0083945 A1, 12.04.2007 wo 2011/066382 A1, 03.06.2011 US 2003/0159184 A1, 21.08.2003 Randhawa G. J., Chhabra R., Singh M. Multiplex PCR-based simultaneous amplification of selectable marker and reporter genes for the screening of genetically modified crops / G. J. Randhawa, R. Chhabra, M. Singh //Journal of agricultural and food chemistry. – 2009. – Т. 57. – №. 12. – С. 5167-5172
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	26.07.2011		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	26.08.2014, Бюл.№ 16		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	26.06.2017, Бюл.№ 12		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2012/048311, 26.07.2012		

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ТРАНСФОРМАНТА СОЇ rDAB9582.814.19.1

(57) Реферат:

Винахід належить до способу визначення трансформанта сої rDAB9582.814.19.1 методом ПЛР.



Фіг. 2

UA 114481 C2

Перехресне посилання на споріднену заявку

Дана заявка заявляє пріоритет попередньої заявки на патент № 61/511658, поданої 26 липня 2011 р., яка повністю включена в даний опис винаходу як посилання.

Рівень техніки

5 Гени, які кодують Cry1F і Cry1Ac synpro (Cry1Ac), здатні надавати трансгенним рослинам стійкості до комах, наприклад, стійкості до лускокрилих комах, і ген, що кодує PAT (фосфинотрицинацетилтрансферазу), здатний надавати трансгенним рослинам стійкості до гербіциду фосфинотрицину (глуфосинат). PAT був успішно експресований в сої як селектований маркер при створенні стійких до комах трансгенних сільськогосподарських культур і білка, що надає трансгенним культурам стійкості до гербіциду глуфосинату в промисловому масштабі.

Відомо, що на експресію чужорідних генів в рослинах впливає їх локалізація в геномі рослини, ймовірно, внаслідок структури хроматину (наприклад, гетерохроматину) або близькості регулюючих транскрипцію елементів (наприклад, енансерів) до сайту інтеграції (Weising et al., Ann. Rev. Genet. 22:421:477, 1988). У той же час наявність трансгена в інших положеннях в геномі по-різному впливає на загальний фенотип рослини. З вказаної причини часто необхідно дослідити велике число трансформантів, щоб виявити трансформант, який характеризується оптимальною експресією введеного гена. Наприклад, встановлено, що рослини і інші організми можуть характеризуватися широким діапазоном зміни рівнів експресії введеного гена в різних трансформантах. Крім того, можуть мати місце відмінності в просторових або часових паттернах експресії, наприклад, відмінності у відносній експресії трансгена в різних тканинах рослини, які не відповідають паттернам, передбачуваним на основі регулюючих транскрипцію елементів, присутніх в конструкції введеного гена. Тому звичайно отримують сотні і тисячі різних трансформантів, які досліджують з метою виявлення єдиного трансформанта, що характеризується необхідними рівнями експресії трансгена і паттернами, придатними для промислових цілей. Трансформант, який має необхідні рівні або паттерни експресії трансгена, придатний для інтрогресії даного трансгена в інші генетичні середовища в результаті ауткроссингу стандартними методами селекції. Потомство таких гібридів зберігає характеристики експресії трансгена первинного трансформанта. Така методика дозволяє гарантувати надійну експресію гена в цілому ряді сортів, добре адаптованих до місцевих умов зростання.

Необхідний метод, який дозволяє виявити наявність конкретного трансформанта і визначити можливість збереження в потомстві гібрида трансгена або групи трансгенів, які представляють інтерес. Крім того, метод виявлення конкретного трансформанта повинен задовольняти вимогам випробування до надходження на ринок і маркування продуктів харчування, які отримуються з рекомбінантних сільськогосподарських культур, наприклад, у випадку контролю за станом навколишнього середовища, контролю ознак сільськогосподарських культур в польових умовах або контролю продуктів, отриманих з сільськогосподарських культур, а також для гарантії відповідності положенням або умовам договору.

Трансгенний трансформант можна виявити будь-яким методом виявлення нуклеїнової кислоти, відомим в даній галузі, який включає, не обмежуючись ними, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) або гібридизацію ДНК з використанням зондів до нуклеїнових кислот. Вказані методи виявлення звичайно ґрунтуються на часто використовуваних генетичних елементах, таких як промотори, термінатори, гени-маркери і т. д., оскільки кодуюча область є взаємозамінною для багатьох конструкцій ДНК. Внаслідок цього такі методи не дозволяють розрізняти різні трансформанти, зокрема, такі трансформанти, які були отримані при використанні однієї конструкції ДНК або дуже схожих конструкцій, якщо не відома послідовність фланкуючої ДНК, розташовані поруч зі вставленою гетерологічною ДНК. Наприклад, трансформантспецифічний аналіз методом ПЛР описаний в заявці на патент США № 2006/0070139 для трансформанта кукурудзи DAS-59122-7. Необхідний простий і чутливий метод ідентифікації трансформанта сої pDAB9582.814.19.1.

Суть винаходу

Даний винахід стосується способу виявлення нового об'єкта трансформації трансгенної сої, стійкої до комах і толерантної до гербіцидів, який був визначений як трансформант сої pDAB9582.814.19.1. Як частина даного винаходу щонайменше 2500 насінин лінії сої, які містять трансформант pDAB9582.814.19.1, було депоновано в Американську колекцію типових культур (ATCC) за адресою: 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110. Вказаний депозит був зареєстрований в ATCC як патентний депозит POTA-12006 21 липня 2011 р. Даний депозит був

зроблений і буде зберігатися відповідно до умов Будапештського договору про міжнародне визнання депонування насіння для цілей патентної процедури.

ДНК рослин сої, які містять даний трансформант, включає з'єднувальні/фланкуючі послідовності, розглянуті в даному описі винаходу, які визначають локалізацію ДНК, введеної в геном сої. Трансформант сої pDAB9582.814.19.1 можна діагностувати на основі SEQ ID NO:1 і SEQ ID NO:2. Зокрема, трансформант сої pDAB9582.814.19.1 можна діагностувати на основі послідовностей, які оточують місця з'єднання в положенні 1400/1401 п. о. і 1536/1537 п. о. SEQ ID NO:1 і 152/153 п. о. SEQ ID NO:2. У нижченаведеному абзаці приведені приклади послідовностей, що включають вказані місця з'єднання, характерні для ДНК сої, що містить трансформант pDAB9582.814.19.1.

Даний винахід стосується способу виявлення трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 в зразку, що містить ДНК сої, який включає:

(а) приведення вказаного зразка в контакт з першим праймером довжиною щонайменше 10 п. о., який вибірково зв'язується з фланкуючою послідовністю в положенні 1-1400 п. о. SEQ ID NO:1 або її комплементом, і з другим праймером довжиною щонайменше 10 п. о., який вибірково зв'язується з вставковою послідовністю в положенні 1401-1836 п. о. SEQ ID NO:1 або її комплементом;

(b) дослідження амплікона, утвореного між вказаними праймерами; або приведення вказаного зразка в контакт з першим праймером довжиною щонайменше 10 п. о., який вибірково зв'язується з вставковою послідовністю в положенні 1-152 п. о. SEQ ID NO:2 або її комплементом, і з другим праймером довжиною щонайменше 10 п. о., який вибірково зв'язується з фланкуючою послідовністю в положенні 153-1550 п. о. SEQ ID NO:2 або її комплементом; і

(c) дослідження амплікона, утвореного між вказаними праймерами.

Інший варіант здійснення винаходу стосується молекули виділеної ДНК, що дозволяє діагностувати трансформант сої pDAB9582.814.19.1. Такі молекули включають, крім SEQ ID NO:1 і 2, ділянку довжиною щонайменше 25 п. о., що містить 1400-1401 п. о. SEQ ID NO:1, і щонайменше 10 п. о. SEQ ID NO:1 в кожному напрямку від місця з'єднання в положенні 1400/1401 п. о.; амплікони довжиною щонайменше 25 п. о., що містять 152-153 п. о. SEQ ID NO:2, і щонайменше 10 п. о. SEQ ID NO:2 в кожному напрямку від місця з'єднання в положенні 152-153 п. о. Як прикладів можна привести 1385-1415 п. о. SEQ ID NO:1; 1350-1450 п. о. SEQ ID NO:1; 1300-1500 п. о. SEQ ID NO:1; 1200-1600 п. о. SEQ ID NO:1; 137-168 п. о. SEQ ID NO:2; 103-203 п. о. SEQ ID NO:2 і 3-303 п. о. SEQ ID NO:2 і їх комплементи.

Даний винахід також стосується аналізів, що дозволяють виявити даний трансформант в зразку (наприклад, в зразку сої). Вказані аналізи можуть бути основані на послідовності ДНК рекомбінантної конструкції, введеної в геном сої, і на геномних послідовностях, фланкуючих інсерційний сайт. У об'єм даного винаходу також входять набори і умови виконання вказаних аналізів.

Даний винахід частково стосується клонування і аналізу послідовностей ДНК крайових областей, що утворюються в результаті інсерції Т-ДНК з pDAB9582 в лініях трансгенної сої. Вказані послідовності є унікальними. На основі вставкових і з'єднувальних послідовностей можуть бути створені і були створені трансформантспецифічні праймери. Аналіз методом ПЛР показав, що вказані трансформанти можуть бути ідентифіковані внаслідок аналізу ампліконів ПЛР, створених при використанні наборів трансформантспецифічних праймерів. Таким чином, для ідентифікації ліній сої, що містять трансформант за даним винаходом, можуть бути використані вищезгадані і інші споріднені методи.

Короткий опис послідовностей

SEQ ID NO:1 є 5'-кінцевою фланкуючою крайовою послідовністю ДНК трансформанта сої 9582.814.19.1. Нуклеотиди 1-1400 є геномною послідовністю. Нуклеотиди 1401-1535 є реаранжированою послідовністю з pDAB9582. Нуклеотиди 1536-1836 є вставковою послідовністю.

SEQ ID NO:2 є 3'-кінцевою фланкуючою крайовою послідовністю ДНК трансформанта сої 9582.814.19.1. Нуклеотиди 1-152 є вставковою послідовністю. Нуклеотиди 153-1550 є геномною послідовністю.

SEQ ID NO:3 є послідовністю ДНК з pDAB9582, яка приведена нижче в таблиці 1.

SEQ ID NO:4 є олігонуклеотидним праймером 81419_FW3, що використовується для підтвердження 5'-кінцевої крайової геномної ДНК.

SEQ ID NO:5 є олігонуклеотидним праймером 81419_RV1, що використовується для підтвердження 3'-кінцевої крайової геномної ДНК.

SEQ ID NO:6 є олігонуклеотидним праймером 81419_RV2, що використовується для підтвердження 3'-кінцевої крайової геномної ДНК.

SEQ ID NO:7 є олігонуклеотидним праймером 81419_RV3, що використовується для підтвердження 3'-кінцевої крайової геномної ДНК.

5 SEQ ID NO:8 є олігонуклеотидним праймером 5'IREnd-01, що використовується для підтвердження 5'-кінцевої крайової геномної ДНК.

SEQ ID NO:9 є олігонуклеотидним праймером 5'IREnd-02, що використовується для підтвердження 5'-кінцевої крайової геномної ДНК.

10 SEQ ID NO:10 є олігонуклеотидним праймером AtUbi10RV1, що використовується для підтвердження 5'-кінцевої крайової геномної ДНК.

SEQ ID NO:11 є олігонуклеотидним праймером AtUbi10RV2, що використовується для підтвердження 5'-кінцевої крайової геномної ДНК.

SEQ ID NO:12 є олігонуклеотидним праймером 3'PATEnd05, що використовується для підтвердження 3'-кінцевої крайової геномної ДНК.

15 SEQ ID NO:13 є олігонуклеотидним праймером 3'PATEnd06, що використовується для підтвердження 3'-кінцевої крайової геномної ДНК.

SEQ ID NO:14 є підтвердженою послідовністю трансформанта сої 9582.814.19.1, яка включає 5'-кінцеву геномну фланкуючу послідовність, вставку Т-ланцюга рDAB9582 і 3'-кінцеву геномну фланкуючу послідовність.

20 SEQ ID NO:15 є олігонуклеотидним праймером 81419_3'F, що використовується для виконання аналізу TAQMAN з метою виявлення 3'-кінцевого краю трансформанта сої 9582.814.19.1.

25 SEQ ID NO:16 є олігонуклеотидним праймером 81419_3'R, що використовується для виконання аналізу TAQMAN з метою виявлення 3'-кінцевого краю трансформанта сої 9582.814.19.1.

SEQ ID NO:17 є олігонуклеотидним зондом 81419_3'P, що використовується для виконання аналізу TAQMAN з метою виявлення 3'-кінцевого краю трансформанта сої 9582.814.19.1. Вказаний зонд має флуоресцентну частину FAM, додану до 5'-кінця, і гасник MGB, доданий до 3'-кінця.

30 SEQ ID NO:18 є олігонуклеотидним праймером GMS116F, що використовується для виконання аналізу TAQMAN з метою виявлення ендегенного еталонного гена GMFL01-25-J19 (GenBank: A286292.1).

35 SEQ ID NO:19 є олігонуклеотидним праймером GMS116R, що використовується для виконання аналізу TAQMAN з метою виявлення ендегенного еталонного гена GMFL01-25-J19 (GenBank: AK286292.1).

SEQ ID NO:20 є олігонуклеотидним зондом GMS116, що використовується для виконання аналізу TAQMAN з метою виявлення ендегенного еталонного гена GMFL01-25-J19 (GenBank: AK286292.1). Вказаний зонд має флуоресцентну частину HEX, додану до 5'-кінця, і гасник BHQ, доданий до 3'-кінця.

40 Короткий опис креслень

На фіг. 1 зображена плазмідна карта рDAB9582, що містить полігенний експресуючий кластер cry1F, cry1Ac і pat.

На фіг. 2 показана локалізація праймерів, які використовуються для підтвердження 5'- і 3'-кінцевої крайової послідовності трансформанта сої рDAB9582.814.19.1.

45 На фіг. 3 показане розташування геномної послідовності в трансформанті сої рDAB9582.814.19.1.

На фіг. 4 показана локалізація праймерів і зондів, що використовуються для виконання аналізу TAQMAN трансформанта сої рDAB9582.814.19.1.

Докладний опис винаходу

50 Обидва кінці інсерції трансформанта сої 9582.814.19.1 були секвеновані і досліджені. Були розроблені трансформантспецифічні аналізи. Вказаний трансформант був також картований на хромосомі 02 генома сої. Даний трансформант може бути введений в інші елітні лінії.

55 Як було вказано вище в розділі "Рівень техніки", введення і інтеграція трансгена в геном рослини передбачає утворення деяких довільних трансформантів (звідси і назва "трансформант" для даної експресованої інсерції). Тобто при використанні багатьох методів трансформації, таких як трансформація *Agrobacterium*, біолістична трансформація (тобто генна рушниця) і трансформація, яка опосередковується карбідом кремнію (тобто WHISKERS), неможливо прогнозувати, в яке місце генома буде введений трансген. Тому ідентифікація фланкуючої геномної ДНК рослини з обох сторін вставки може мати важливе значення для ідентифікації рослини, що містить даний інсерційний трансформант. Наприклад, можуть бути

створені праймери для ПЛР, які утворюють амплікон ПЛР в області з'єднання вставки з геномом хазяя. Такий амплікон ПЛР може бути використаний для ідентифікації унікального або відмінного типу інсерційного трансформанта.

У даному описі винаходу приведені визначення термінів і приклади, які сприяють розумінню даного винаходу і допомагають фахівцям в даній галузі здійснити даний винахід на практиці. За винятком особливо обумовлених випадків терміни мають значення, відомі фахівцям в даній галузі. Номенклатура основ ДНК відповідає приведеній в розділі 37 Зводу федеральних правил, §1.822.

У використаному тут значенні термін "потомство" означає потомство будь-якого покоління батьківської рослини, що містить трансформант сої рDAB9582.814.19.1.

Трансгенний "трансформант" отримують шляхом трансформації рослинних клітин гетерологічною ДНК, тобто конструкцією нуклеїнової кислоти, що включає трансгени, які представляють інтерес, регенерації популяції рослин, отриманої в результаті інсерції вказаного трансгена в геном рослини, і відбору конкретної рослини, що характеризується наявністю інсерції в певному положенні в геномі. Термін "трансформант" стосується первинного трансформанта і потомства вказаного трансформанта, що включає гетерологічну ДНК. Термін "трансформант" також стосується потомства, отриманого в результаті ауткроссингу трансформанта з іншим сортом, що включає геномну/трансгенну ДНК. Навіть після повторного зворотного схрещування з батьківською формою, з якою гібрид схрещується знову, введена трансгенна ДНК і фланкуюча геномна ДНК (геномна/трансгенна ДНК) з трансформованої батьківської форми присутні в потомстві гібрида в тому ж положенні в хромосомі. Термін "трансформант" також стосується ДНК первинного трансформанта і його потомства, що включає введену ДНК і фланкуючу геномну послідовність поруч з введеною ДНК, які повинні бути передані потомству, включаючи транс ген, який представляє інтерес, в результаті схрещування однієї батьківської форми, що включає введену ДНК (наприклад, первинний трансформант і потомство, отримане в результаті самозапилення), з батьківською формою, що не містить введену ДНК.

"З'єднувальна послідовність" або "крайова послідовність" заповнює ділянку, на якій ДНК, введена в геном, зв'язується з ДНК нативного генома сої, фланкуючої інсерційну ділянку, при цьому для діагностики трансформанта достатньо ідентифікувати або виявити одну або декілька з'єднувальних послідовностей в генетичному матеріалі рослини. До таких послідовностей належать послідовності ДНК, що заповнюють місця вставки трансформантів сої за даним винаходом, і фланкуючі ДНК однакової довжини. У даному описі винаходу приведені конкретні приклади таких діагностичних послідовностей; однак, інші послідовності, які перекривають місця з'єднання інсерцій або місця з'єднання інсерцій і геномної послідовності, також є діагностичними і можуть бути використані відповідно до даного винаходу.

Даний винахід частково стосується ідентифікації таких фланкуючих, з'єднувальних і вставкових послідовностей. У об'єм даного винаходу входять відповідні праймери і амплікони ПЛР. Відповідно до даного винаходу для виявлення або ідентифікації промислових сортів трансгенної сої або ліній, виділених з ліній трансгенної сої, що є приватною власністю, можуть бути використані методи ПЛР із застосуванням ампліконів, розташованих поруч з введеною ДНК і її крайові послідовності.

Фланкуючі/з'єднувальні послідовності дозволяють діагностувати трансформант сої рDAB9582.814.19.1. На основі вказаних послідовностей були створені трансформантспецифічні праймери. Аналіз методом ПЛР показав, що вказані лінії сої можна ідентифікувати в різних генотипах сої внаслідок аналізу ампліконів ПЛР, утворених при використанні вказаних наборів трансформантспецифічних праймерів. Таким чином, вищезгадані і інші споріднені методи можуть бути використані для унікальної ідентифікації ліній сої. Послідовності, ідентифіковані в даному описі винаходу, є унікальними.

Методи виявлення за даним винаходом особливо корисні в поєднанні з селекцією рослин для визначення потомства рослин, що включає даний трансформант, який був отриманий після схрещування батьківської рослини, що включає трансформант, який представляє інтерес, з іншою лінією рослин з метою надавання вказаному потомству однієї або декількох додаткових ознак. Вказані методи ПЛР дозволяють ефективно розробляти програми селекції сої і контролювати якість, зокрема, промислового насіння трансгенної сої. У цей час також можуть бути створені і використані набори для виявлення методом ПЛР вказаних ліній трансгенної сої. Вказані методи також дозволяють реєструвати і зберігати продукти.

Крім того, фланкуючі/геномні послідовності сої можуть бути використані для специфічної ідентифікації положення кожної вставки в геномі. Така інформація може бути використана для створення систем молекулярних маркерів, специфічних до кожного трансформанту. Вказані

послідовності можуть бути використані для прискореної селекції і отримання даних про зчеплення генів.

Інформація про фланкуючі послідовності може бути далі використана для вивчення і дослідження процесів інтеграції трансгенів, визначення сайтів для інтеграції трансгенів в геномі, сортування трансформантів, визначення стійкості трансгенів і їх фланкуючих послідовностей і експресії генів (особливо відносно сайленсингу генів, паттернів метилування трансгенів, впливу положення і можливих елементів, які визначають експресію, таких як MAR [області приєднання матриці] і тому подібних).

У світлі даного опису винаходу повинно бути зрозуміло, що в об'єм даного винаходу входить насіння, депоноване в АТСС під номером, вказаним в абзаці [0005]. Даний винахід також стосується рослини сої, стійкої до гербіцидів, вирощеної з насіння, депонованого в АТСС під номером, вказаним в абзаці [0005]. Даний винахід далі стосується частин вказаної рослини, таких як листя, зразки тканин, насіння, вироблене вказаною рослиною, пилок і тому подібні (які включають сгу1F, сгу1Ac, раg і SEQ ID NO:1 і 2).

У використаному тут значенні термін "соя" означає вид *Glycine max* і включає всі сорти даного виду, які можуть бути отримані шляхом селекції рослини сої.

Молекули ДНК за даним винаходом можуть бути використані як молекулярні маркери при здійсненні методу селекції з використанням маркерів (МАВ). Молекули ДНК за даним винаходом (такі як маркери AFLP, маркери RFLP, маркери RAPD, SNP і SSR) можуть бути використані в методах, що дозволяють ідентифікувати генетично зв'язані агрономічно корисні ознаки, відомі в даній галузі. Ознаки стійкості до комах і гербіцидів можуть бути прослідковані в потомстві гібрида рослини сої за даним винаходом (або в її потомстві і в будь-якому іншому культиварі або сорті сої) за допомогою методів МАВ. Молекули ДНК є маркерами даної ознаки, і методи МАВ, добре відомі в даній галузі, можуть бути використані для відстеження ознаки стійкості до гербіцидів в рослинах сої, якщо щонайменше одна лінія сої за даним винаходом або її потомство було батьком або предком. Способи за даним винаходом можуть бути використані для ідентифікації будь-якого сорту сої, що має трансформант за даним винаходом.

У використаному тут значенні термін "лінія" означає групу рослин, які характеризуються незначною або відсутністю спадкової мінливості серед особин відносно щонайменше однієї ознаки. Такі лінії можуть бути створені декількома поколіннями самозапилення і селекції або вегетативного розмноження з однієї родової форми за допомогою методів з використанням культур тканин або клітин.

У використаному тут значенні терміни "культивар" і "сорт" є синонімами і означають лінію, яка використовується для промислового виробництва.

Термін "стійкість" або "стійкий" застосовно до певного компонента означає збереження даного компонента з покоління в покоління, переважно протягом щонайменше трьох поколінь.

Термін "комерційна корисність" означає хорошу потужність рослини і високу фертильність, завдяки яким фермери можуть вирощувати дану сільськогосподарську культуру з використанням звичайних сільськогосподарських машин і можуть екстрагувати з насіння олію з описаними компонентами за допомогою звичайного подрібнюючого і екстрагуючого обладнання.

Термін "агрономічно елітна" означає лінію, яка має необхідні агрономічні характеристики, такі як врожайність, дозрівання, стійкість до хвороб і тому подібні, крім стійкості до комах і гербіцидів, завдяки наявності одного або декількох трансформантів за даним винаходом. Будь-які і всі вказані агрономічні характеристики і дані можуть бути використані для ідентифікації таких рослин на основі однієї ознаки, частини діапазону або всього діапазону характеристик, що використовуються для визначення таких рослин.

Як повинно бути зрозуміло фахівцям в даній галузі в світлі даного опису винаходу, переважні варіанти наборів для виявлення ознак за даним винаходом можуть включати, наприклад, зонди і/або праймери, призначені для створення і/або включаючи "з'єднувальні послідовності" або "перехідні послідовності" (де геномна фланкуюча послідовність сої стикується зі вставковою послідовністю). Наприклад, даний набір включає полінуклеотидні зонди, праймери і/або амплікони, створені для ідентифікації однієї або обох з'єднувальних послідовностей (де вставка стикується з фланкуючою послідовністю), представлені в приведеній вище таблиці. Однією спільною особливістю такого набору є наявність одного праймера, який гібридизує у фланкуючій області, і одного праймера, який гібридизує у вставці. Такі праймери часто мають довжину, яка дорівнює щонайменше приблизно ~15 залишкам. Вказані праймери можуть бути використані для створення/ампліфікації амплікона, що виявляється, який вказує на наявність трансформанта за даним винаходом. Праймери можуть

бути використані для створення амплікона, що заповнює (і що включає) вищезгадану з'єднувальну послідовність.

Праймер, який "забезпечує з'єднання" в фланкуючій послідовності, звичайно не гібридує на відстані більше приблизно 1200 основ або за межами з'єднання. Таким чином, типові фланкуючі праймери включають щонайменше 15 залишків ланцюга в межах 1200 основ фланкуючих послідовностей від початку вставки. Тобто в об'єм даного винаходу входять праймери, що включають послідовність відповідної довжини, яка складається з (або гібридує з) пар основ 800-1400 SEQ ID NO:14 і/або пар основ 13897-14497 SEQ ID NO:14. Праймери для вставки можуть бути створені аналогічним чином в будь-якому місці вставки, але для створення таких праймерів можуть бути також використані пари основ 1400-2000 SEQ ID NO:14 і/або пари основ 13297-13896 SEQ ID NO:14.

Фахівцеві в даній галузі повинне бути також відомо, що праймери і зонди можуть бути створені з можливістю гібридизації в стандартних умовах гібридизації і/або ПЛР, коли праймер або зонд не є повністю комплементарними приведений послідовності. Тобто допустимий деякий ступінь помилкового спарювання. Наприклад, в праймері, який складається приблизно з 20 нуклеотидів, звичайно один, два або близько того нуклеотидів можуть не зв'язуватися з протилежним ланцюгом, якщо помилково спарена основа знаходиться всередині або біля кінця праймера, протилежного амплікону. Нижче приведені різні прийнятні умови гібридизації. У зондах також можуть бути використані синтетичні аналоги нуклеотидів, такі як інозин. Також можуть бути використані пептидні зонди нуклеїнових кислот (PNA), а також ДНК- і РНК-зонди. Важливо, щоб такі зонди і праймери дозволяли діагностувати (однозначно ідентифікувати і виявляти) наявність трансформанта за даним винаходом.

Потрібно зазначити, що при ампліфікації методом ПЛР можуть виникати помилки, які викликають, наприклад, незначні помилки секвенування. Тобто, за винятком особливо обумовлених випадків, послідовності, приведені в даному описі винаходу, були визначені внаслідок створення довгих ампліконів з геномних ДНК сої, після чого амплікони клонували і секвенували. У послідовностях, створених і визначених таким чином, цілком ймовірно, можуть бути виявлені невеликі відмінності і незначні розходження, пов'язані з численними циклами ампліфікації, необхідними для створення амплікона достатньої довжини для секвенування з геномних ДНК. Фахівцеві в даній галузі повинно бути зрозуміло, що в об'єм даного винаходу входять будь-які коректування, необхідні в зв'язку з виникненням звичайних помилок секвенування або розходжень вказаних типів.

Потрібно також зазначити, що можливе видалення деякої геномної послідовності, наприклад, при введенні послідовності в процесі створення трансформанта. Таким чином, фланкуючі послідовності за даним винаходом можуть дещо відрізнятися від геномних послідовностей, представлених, наприклад, в базі даних GENBANK.

Компоненти "вставки" послідовності ДНК показані на фігурах і більш детально розглянуті нижче в розділі "Приклади". Полінуклеотидні послідовності ДНК вказаних компонентів або їх фрагменти можуть бути використані як ДНК-праймери або зонди при здійсненні способів за даним винаходом.

Деякі варіанти здійснення винаходу стосуються способів виявлення трансгена/інсерційної області генома в рослинах, насінні і подібних частинах рослини сої, і композицій для здійснення вказаних способів. Створені послідовності ДНК, що включають 5'-кінцеву з'єднувальну послідовність трансгена/інсерційної області генома за даним винаходом (між 800-1400 парами основ SEQ ID NO:14), їх сегменти, компленти приведених послідовностей і будь-які їх сегменти. Створені послідовності ДНК, що включають 3'-кінцеву з'єднувальну послідовність трансгена/інсерційної області генома за даним винаходом (між 13897-14497 парами основ SEQ ID NO:14), їх сегменти, компленти приведених послідовностей і будь-які їх сегменти. З'єднувальна послідовність інсерційної області заповнює місце з'єднання між гетерологічною ДНК, введеною в геном, і ДНК з клітини сої, фланкуючої інсерційний сайт. Такі послідовності дозволяють діагностувати даний трансформант.

На основі вказаної вставки і крайових послідовностей можуть бути створені трансформантспецифічні праймери. Аналіз методом ПЛР показав, що лінії сої за даним винаходом можуть бути ідентифіковані в різних генотипах сої шляхом аналізу ампліконів ПЛР, створених за допомогою наборів трансформантспецифічних праймерів. Для ідентифікації ліній сої за даним винаходом можуть бути використані вищезгадані і інші споріднені методи. Таким чином, амплікони ПЛР, отримані з таких пар праймерів, є унікальними і можуть бути використані для ідентифікації вказаних ліній сої.

Деякі варіанти здійснення винаходу стосуються послідовностей ДНК, що включають суміжний фрагмент нового трансгена/інсерційної області генома. У об'єм даного винаходу

входять послідовності ДНК, що включають полінуклеотиди вставкової послідовності трансгена достатньої довжини і полінуклеотиди геномної послідовності сої достатньої довжини, з однієї або більше ніж з трьох вищезгаданих рослин сої, і/або послідовності, придатні для використання як послідовності праймерів з метою отримання амплікона, що дозволяє діагностувати одну або декілька вказаних рослин сої.

Споріднені варіанти здійснення винаходу стосуються послідовностей ДНК, що включають щонайменше 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 або більше суміжним нуклеотидів частини трансгена послідовності ДНК, ідентифікованої в даному описі винаходу (такої як SEQ ID NO:1 і її сегменти), або її комплементів, і фланкуючої послідовності ДНК сої аналогічної довжини з вказаних послідовностей або їх комплементів. Такі послідовності можуть бути використані як ДНК-праймери при здійсненні методів ампліфікації ДНК. Амплікони, отримані з допомогою вказаних праймерів, дозволяють діагностувати будь-які трансформанти сої за даним винаходом. Тому даний винахід також стосується ампліконів, отриманих з допомогою таких ДНК-праймерів і гомологічних праймерів.

Даний винахід також стосується способів виявлення в зразку ДНК, що відповідає трансформанту сої за даним винаходом. Такі способи можуть включати: (a) приведення зразка, що включає ДНК, в контакт з набором праймерів, які при використанні в реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з ДНК щонайменше одного з вказаних трансформантів сої, утворюють амплікон, що дозволяє діагностувати вказаний трансформант; (b) виконання реакції ампліфікації нуклеїнової кислоти з утворенням амплікона; і (c) виявлення отриманого амплікона.

Інші способи виявлення за даним винаходом включають спосіб виявлення в зразку ДНК, що відповідає вказаному трансформанту, який включає: (a) приведення зразка, що включає ДНК, в контакт з праймером, який гібридує в суворих умовах гібридизації з ДНК щонайменше одного з вказаних трансформантів сої і не гібридує в суворих умовах гібридизації з ДНК контрольної рослини сої (ДНК трансформанта, який не представляє інтерес); (b) гібридизацію зразка і зонда в суворих умовах гібридизації; і (c) виявлення гібридизації зонда з вказаною ДНК.

Набори для виявлення ДНК можуть бути створені з використанням композицій за даним винаходом і методів, добре відомих в галузі виявлення ДНК. Вказані набори можуть бути використані для ідентифікації ДНК трансформанта сої за даним винаходом в зразку і в процесі селекції рослин сої, що містять вказану ДНК. Набори включають послідовності ДНК, гомологічні або комплементарні ампліконам, розглянутим в даному описі винаходу, або послідовності ДНК, гомологічні або комплементарні ДНК, що міститься в генетичних елементах трансгена трансформантів за даним винаходом. Вказані послідовності ДНК можуть бути використані при здійсненні реакцій ампліфікації ДНК або як зонди в процесі гібридизації ДНК. Набори можуть також містити реагенти і речовини, необхідні для виконання даного методу виявлення.

Термін "зонд" означає виділену молекулу нуклеїнової кислоти, до якої приєднана стандартна детектована мітка або репортерна молекула (така як радіоактивний ізотоп, ліганд, хемілюмінесцентна речовина або фермент). Такий зонд є комплементарним ланцюгу нуклеїнової кислоти-мішені у випадку даного винаходу, ланцюгу геномної ДНК одного з вказаних трансформантів сої з рослини сої або зразка, що включає ДНК даного трансформанта. Зонди за даним винаходом включають не тільки дезоксирибонуклеїнові або рибонуклеїнові кислоти, але також поліаміди і інші речовини зонда, які специфічно зв'язуються з послідовністю ДНК-мішені і можуть бути використані для виявлення вказаної послідовності ДНК-мішені.

Термін "праймери" означає виділені/синтезовані нуклеїнові кислоти, які гібридизовані з ланцюгом комплементарної ДНК-мішені методом гібридизації нуклеїнових кислот з утворенням гібрида між праймером і ланцюгом ДНК-мішені і потім подовжені по ланцюгу ДНК-мішені полімеразою, наприклад, ДНК-полімеразою. Пари праймерів за даним винаходом використовують для ампліфікації послідовності нуклеїнової кислоти-мішені, наприклад, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) або інших стандартних методів ампліфікації нуклеїнових кислот.

Зонди і праймери звичайно складаються з

5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,
 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43,
 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68,
 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93,
 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113,
 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131,
 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149,
 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167,
 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185,
 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203,
 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221,
 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239,
 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257,
 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275,
 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293,
 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311,
 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329,
 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347,
 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365,
 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383,
 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401,
 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419,
 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437,
 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455,
 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473,
 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491,
 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499 или 500

або

- 5 або більшого числа полінуклеотидів. Такі зонди і праймери специфічно гібридизують з послідовністю-мішенню в суворих умовах гібридизації. Зонди і праймери за даним винаходом переважно мають повну схожість послідовності з послідовністю-мішенню, хоч стандартними методами можуть бути створені зонди, відмінні від послідовності-мішені, але які зберігають здатність гібридизувати з послідовностями-мішенями.
- 10 Методи отримання і використання зондів і праймерів описані, наприклад, в публікації *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Пари праймерів для ПЛР можуть бути виділені з відомої послідовності, наприклад, за допомогою комп'ютерних програм, призначених для вказаної мети.
- 15 Праймери і зонди на основі фланкуючих послідовностей ДНК і вставкових послідовностей за даним винаходом можуть бути використані для підтвердження (і при необхідності для корекції) розглянутих послідовностей стандартними методами, наприклад, методами повторного клонування і секвенування таких послідовностей.
- 20 Зонди і праймери нуклеїнових кислот за даним винаходом гібридизують в суворих умовах з послідовністю ДНК-мішені. Для ідентифікації ДНК з трансгенного трансформанта в зразку можуть бути використані будь-які стандартні методи гібридизації або ампліфікації нуклеїнових кислот. Молекули нуклеїнових кислот або їх фрагменти можуть специфічно гібридизувати з іншими молекулами нуклеїнових кислот в певних умовах. Як указано в даному описі винаходу,

дві молекули нуклеїнових кислот можуть специфічно гібридизувати одна з одною, якщо такі молекули здатні утворювати непаралельну дволанцюжкову структуру нуклеїнової кислоти. Вважається, що молекула нуклеїнової кислоти є "комплементом" іншої молекули нуклеїнової кислоти, якщо вказані молекули є повністю комплементарними. Як вказано в даному описі винаходу, молекули є "повністю комплементарними", якщо кожний нуклеотид однієї молекули комплементарний нуклеотиду іншої молекули. Дві молекули вважаються "мінімально комплементарними", якщо вказані молекули здатні гібридизувати одна з одною з достатнім ступенем стійкості для збереження гібрида щонайменше в умовах зниженої суворості. Аналогічним чином молекули вважаються "комплементарними", якщо вказані молекули здатні гібридизувати одна з одною з достатнім ступенем стійкості для збереження гібрида в стандартних суворих умовах. Стандартні суворі умови гібридизації описані в публікації Sambrook et al., 1989. Відхилення від повної комплементарності допустимі, якщо такі відхилення повністю не анулюють здатність молекул утворювати дволанцюжкову структуру. Молекула нуклеїнової кислоти, яка може бути використана як праймер або зонд, повинна мати достатньо комплементарну послідовність, здатну утворювати стійку дволанцюжкову структуру при певних концентраціях розчинника і солі.

У використаному тут значенні по суті гомологічна послідовність є послідовністю нуклеїнової кислоти, яка специфічно гібридує з комплементом послідовності нуклеїнової кислоти, що порівнюється в суворих умовах гібридизації. Термін "суворі умови" застосовно до гібридизації зонда до нуклеїнової кислоти з нуклеїновою кислотою-мішенню (тобто з конкретною послідовністю нуклеїнової кислоти, яка представляє інтерес) методом специфічної гібридизації описаний в публікації Sambrook et al., 1989, стор. 9.52-9.55. Див. також публікацію Sambrook et al., 1989, стор. 9.47-9.52 і 9.56-9.58. Таким чином, нуклеотидні послідовності за даним винаходом можуть бути використані завдяки їх здатності вибірково утворювати дуплексні молекули з комплементарними ділянками фрагментів ДНК.

Залежно від передбачуваного застосування можна використовувати різні умови гібридизації для досягнення різних ступенів вибіркової зонда відносно послідовності-мішені. Для застосувань, що вимагають високої вибіркової, звичайно використовують відносно суворі умови утворення гібридів, наприклад, можуть бути вибрані умови, що характеризуються відносно низькою концентрацією солі і/або високою температурою, наприклад, що досягаються при використанні від близько 0,02 М до близько 0,15 М NaCl при температурі від близько 50°C до близько 70°C. Суворі умови, наприклад, можуть включати щонайменше двократне промивання фільтра для гібридизації суворим промиваючим буфером (0,2-кратний об'єм SSC, 0,1 % SDS, 65 °C). Фахівцям в даній галузі відомі відповідні суворі умови, стимулюючі гібридизацію ДНК, наприклад, 6,0-кратний об'єм хлориду натрію/цитрату натрію (SSC) при температурі близько 45°C з подальшим промиванням 2,0-кратним об'ємом SSC при 50°C. Наприклад, концентрація солі на стадії промивання може бути вибрана в діапазоні від умов зниженої суворості, що включають використання приблизно 2,0-кратного об'єму SSC при 50°C, до суворих умов, що включають використання приблизно 0,2-кратного об'єму SSC при 50°C. Крім того, температура на стадії промивання може бути підвищена від кімнатної температури, приблизно 22°C, що створюється в умовах зниженої суворості, до температури близько 65°C, що застосовується в суворих умовах. Можуть бути змінені як температура, так і концентрація солі, або один з параметрів, температура або концентрація солі, може залишатися постійним при зміні іншого параметра. Такі вибіркові умови допускають незначні, якщо взагалі допускають, помилкові спарювання між зондом і матрицею або ланцюгом-мішенню. Фахівцям в даній галузі добре відомі методи виявлення послідовностей ДНК шляхом гібридизації, і як приклад таких аналізів методом гібридизації можна привести патенти США №№ 4965188 і 5176995.)

У особливо переважному варіанті здійснення винаходу нуклеїнова кислота за даним винаходом специфічно гібридує в суворих умовах з одним або декількома праймерами (ампліконами або іншими послідовностями), приведеними або запропонованими в даному описі винаходу, включаючи їх комплементи і фрагменти. У одному об'єкті даного винаходу маркерна молекула нуклеїнової кислоти за даним винаходом включає послідовність нуклеїнової кислоти, представлену в одній з приведених послідовностей, її комплементи і/або фрагменти.

У іншому об'єкті даного винаходу маркерна молекула нуклеїнової кислоти за даним винаходом включає послідовність, яка ідентична таким послідовностям нуклеїнових кислот на 80 %-100 % або 90 %-100 %. У ще одному об'єкті даного винаходу маркерна молекула нуклеїнової кислоти за даним винаходом ідентична такій послідовності на 95 %-100 %. Такі послідовності можуть бути використані як маркери в процесі селекції рослин для ідентифікації потомства генетичних гібридів. Гібридизацію зонда з молекулою ДНК-мішені можна виявити

різними методами, відомими фахівцям в даній галузі, які включають, не обмежуючись ними, флуоресцентні мітки, радіоактивні мітки, мітки на основі антитіл і хемілюмінесцентні мітки.

У випадку ампліфікації послідовності-мішені нуклеїнової кислоти (наприклад, методом ПЛР) з використанням конкретної пари праймерів для ампліфікації "суворі умови" являють собою умови, в яких вказана пара праймерів гібридує тільки з послідовністю-мішенню нуклеїнової кислоти, з якою праймер, що має відповідну послідовність дикого типу (або її комплемент), повинен зв'язуватися і переважно продукувати унікальний продукт ампліфікації, амплікон.

Термін "специфічний до (послідовності-мішені)" означає, що зонд або праймер гібридує в суворих умовах гібридизації тільки з послідовністю-мішенню в зразку, що включає таку послідовність-мішень.

У використаному тут значенні термін "ампліфікована ДНК" або "амплікон" означає продукт ампліфікації нуклеїнової кислоти послідовності-мішені нуклеїнової кислоти, що є частиною матриці нуклеїнової кислоти. Наприклад, для визначення наявності в рослині сої, отриманій в результаті статевого схрещування, геномної ДНК трансгенного трансформанта з рослини сої за даним винаходом, ДНК, екстрагована із зразка тканини рослини сої, може бути піддана ампліфікації нуклеїнової кислоти з використанням пари праймерів, з яких один праймер виділений з фланкуючої послідовності, локалізованої в геномі рослини поруч з інсерційним сайтом вставленої гетерологічної ДНК, і другий праймер виділений з вставленої гетерологічної ДНК, для продукування амплікона, що дозволяє діагностувати наявність ДНК трансформанта. Трансформант також можна діагностувати на основі довжини і послідовності амплікона. Довжина амплікона може дорівнювати загальній довжині пар праймерів і однієї пари нуклеотидних основ і/або загальній довжині пар праймерів і приблизно

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,
26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50,
51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75,
76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99,
100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117,
118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135,
136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153,
154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171,
172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189,
190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207,
208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225,
226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243,
244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261,
262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279,
280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297,
298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315,
316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333,
334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351,
352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369,
370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387,

388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405,
 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423,
 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441,
 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459,
 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477,
 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495,
 496, 497, 498, 499, or 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000

або більшому числу пар нуклеотидних основ (плюс або мінус будь-яке число вищезгаданих приставок). Альтернативно пара праймерів може бути виділена з фланкуючої послідовності з обох сторін вставленої ДНК з утворенням амплікона, що включає всю нуклеотидну послідовність вставки. Один член пари праймерів, виділеної з геномної послідовності рослини, може бути розташований на відстані від вставленої послідовності ДНК. Вказана відстань може становити від однієї пари нуклеотидних основ приблизно до двадцяти тисяч пар нуклеотидних основ. У визначення терміну "амплікон" входять димери праймерів, які можуть бути утворені при виконанні термічної реакції ампліфікації ДНК.

Нуклеїнова кислота може бути ампліфікована різними методами ампліфікації нуклеїнових кислот, відомими в даній галузі, включаючи полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). У даній галузі відомі різні методи ампліфікації, які описані, нарівні з іншими публікаціями, в патенті США № 4683195 і патенті США № 4683202. Методами ПЛР можна ампліфікувати до 22 т.п.о. геномної ДНК. При здійсненні даного винаходу можуть бути використані вказані методи, а також інші методи ампліфікації ДНК, відомі в даній галузі. Послідовність ДНК-вставки або фланкуючої геномної послідовності гетерологічного трансгена з трансформанта сої за даним винаходом може бути перевірена (і при необхідності скоригована) шляхом ампліфікації таких послідовностей трансформанта за допомогою праймерів, виділених з послідовностей за даним винаходом, стандартними методами секвенування ДНК амплікона ПЛР або клонованої ДНК.

Амплікон, отриманий вказаними методами, може бути виявлений різними методами. Електрофорез в агарозному гелі і фарбування бромідом етидію є загальноприйнятими, добре відомим методом виявлення ампліконів ДНК. Іншим таким методом є генетичний двійковий аналіз з використанням олігонуклеотиду ДНК, що перекриває суміжну фланкуючу геномну послідовність ДНК і вставлену послідовність ДНК. Вказаний олігонуклеотид іммобілізують в ямках мікропланшета. Після ПЛР області, яка представляє інтерес (з використанням одного праймера у вставленій послідовності і одного праймера в суміжній фланкуючій геномній послідовності), одноланцюжковий продукт ПЛР може бути гібридизований з іммобілізованим олігонуклеотидом і використаний як матриця для виконання реакції подовження на одну основу з використанням ДНК-полімерази і міченими ddNTP, специфічними до передбачуваної наступної основи. Зчитування може бути зроблене за допомогою флуоресцентного аналізу або ELISA. Сигнал вказує на наявність вставки/фланкуючої послідовності внаслідок успішної ампліфікації, гібридизації і подовження на одну основу.

Іншим методом є метод піросеквенування, описаний в публікації Winge, Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000. При виконанні вказаного методу створюють олігонуклеотид, який перекриває місце з'єднання суміжної геномної ДНК і вставлену ДНК. Олігонуклеотид гібридизують з одноланцюжковим продуктом ПЛР з області, яка представляє інтерес (один праймер у вставленій послідовності і один праймер у фланкуючій геномній послідовності), і інкубують в присутності ДНК-полімерази, АТР, сульфурілази, люциферази, апірази, аденозин-5'-фосфосульфату і люциферину. Окремо додають DNTP, в результаті чого виникає світловий сигнал, який вимірюють. Світловий сигнал свідчить про наявність вставки/фланкуючої послідовності трансгена внаслідок успішної ампліфікації, гібридизації і подовження на одну або декілька основ.

Поляризація флуоресценції є ще одним методом, який може бути використаний для виявлення амплікона за даним винаходом. Відповідно до даного методу створюють олігонуклеотид, який перекриває місце з'єднання геномної фланкуючої послідовності і вставленої ДНК. Олігонуклеотид гібридизують з одноланцюжковим продуктом ПЛР з області, яка представляє інтерес (один праймер у вставленій ДНК і один праймер у фланкуючій геномній послідовності ДНК) і інкубують в присутності ДНК-полімерази і міченого флуоресцентним барвником ddNTP. Подовження на одну основу спричиняє включення ddNTP. Таке включення можна виміряти у вигляді зміни поляризації за допомогою флуорометра. Зміна поляризації

свідчить про наявність вставки/фланкуючої послідовності трансгена внаслідок успішної ампліфікації, гібридизації і подовження на одну основу.

TAQMAN (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) є методом виявлення і кількісного визначення наявності послідовності ДНК. У короткому викладі даний метод включає створення олігонуклеотидного зонда FRET, який перекриває місце з'єднання геномної фланкуючої і вставкової ДНК. Зонд FRET і праймери для ПЛР (один праймер в послідовності вставкової ДНК і один праймер у фланкуючій геномній послідовності) піддають циклічній обробці в присутності термостійкої полімерази і dNTP. У процесі специфічної ампліфікації taq полімераза ДНК відщеплюється і вивільняє флуоресцентну частину з гасильної частини зонда FRET. Флуоресцентний сигнал свідчить про наявність фланкуючої/вставкової послідовності трансгена внаслідок успішної ампліфікації і гібридизації.

Для виявлення послідовності був запропонований метод молекулярних маяків. У короткому викладі даний метод включає створення олігонуклеотидного зонда FRET, який перекриває місце з'єднання фланкуючої геномної і вставкової ДНК. Унікальна структура зонда FRET дозволяє отримати вторинну структуру, що містить флуоресцентну і гасильну частини в безпосередній близькості одну від одної. Зонд FRET і праймери для ПЛР (один праймер в послідовності вставкової ДНК і один праймер у фланкуючій геномній послідовності) піддають циклічній обробці в присутності термостійкої полімерази і dNTP. Після успішної ампліфікації методом ПЛР гібридизація зонда FRET з послідовністю-мішенню спричиняє видалення вторинної структури зонда і просторове відділення флуоресцентної і гасильної частин. Виникає флуоресцентний сигнал. Флуоресцентний сигнал свідчить про наявність фланкуючої геномної/вставкової послідовності трансгена внаслідок успішної ампліфікації і гібридизації.

Крім розглянутого положення в геномі сої, яке є найбільш прийнятним для інсерції, даний винахід також стосується насіння сої і/або рослини сої, що включає щонайменше одну вставку, відмінну від трансформанта сої 9582.814.19.1, в безпосередній близькості від даного положення в геномі. Один варіант здійснення винаходу стосується заміни трансформанта rDAB9582.814.19.1, розглянутого в даному описі винаходу, іншою вставкою. Для вказаної мети може бути використана, наприклад, направлена гомологічна рекомбінація. Даний метод описаний, наприклад, у WO 03/080809 A2 і відповідній опублікованій заявці на патент США (US 20030232410). Таким чином, даний винахід стосується рослин і рослинних клітин, що включають гетерологічну вставку (замість або разом з декількома копіями генів cry1F, cry1Ac або pat), фланковану повними фланкуючими послідовностями або пізнаваними частинами фланкуючих послідовностей за даним винаходом (пари основ 1-1400 SEQ ID NO:1 і пари основ 153-1550 SEQ ID NO:2). Подібним чином може бути використана для вставки додаткова копія (або додаткові копії) генів cry1F, cry1Ac або pat.

Всі патенти, заявки на патент, попередні заявки і публікації, приведені в даному винаході, повністю включені в даний опис винаходу як посилання в тій мірі, в якій вони відповідають положенням даного винаходу.

Приведені нижче приклади ілюструють способи здійснення винаходу і демонструють певні переважні варіанти здійснення винаходу. Вказані приклади не обмежують об'єм винаходу. Фахівцям в даній галузі повинно бути зрозуміло, що методи, описані в нижченаведених прикладах, представляють певні підходи, які використовуються для ілюстрації переважних варіантів здійснення винаходу. Однак фахівцям в даній галузі повинно бути зрозуміло в світлі даного опису винаходу, що в конкретні варіанти здійснення винаходу можуть бути внесені багато змін, що дозволяють отримати аналогічні або подібні результати, не виходячи за межі суті і об'єму винаходу. За винятком особливо обумовлених випадків всі проценти є масовими процентами і співвідношення сумішей розчинників є об'ємними співвідношеннями.

За винятком особливо обумовлених випадків в даному описі винаходу використані наступні аббревіатури.

п. о.	пара основ
°C	градуси по шкалі Цельсія
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
EDTA	етилендіамінтетраоцтова кислота
т.п.о.	тисяча пар основ
мкг	мікрограм
мкл	мікролітр
мл	мілілітр
М	молярна маса
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція

PTU транскрипційна одиниця рослини
 SDS додецилсульфат натрію
 SSC буферний розчин, що містить суміш хлориду натрію і цитрату натрію, pH 7,0
 TBE буферний розчин, що містить суміш тріс-буфера з основою, борної кислоти і EDTA, pH 8,3

Варіанти здійснення даного винаходу представлені в наступних прикладах. Потрібно зазначити, що вказані приклади приведені тільки з метою ілюстрації. На основі приведеного вище опису винаходу і прикладів фахівець в даній галузі може ознайомитися з основними характеристиками даного винаходу і, не виходячи за межі суті і об'єму винаходу, внести різні зміни і модифікації у варіанти здійснення винаходу, що дозволяють адаптувати винахід до різних застосувань і умов реалізації. Таким чином, фахівцям в даній галузі, крім вищеописаних варіантів здійснення винаходу, повинні бути очевидні багато інших модифікацій варіантів здійснення винаходу. Такі модифікації також входять в об'єм прикладеної формули винаходу.

Всі публікації, приведені в даному винаході, повністю включені в даний опис винаходу як посилання.

Приклади

Приклад 1. Трансформація і відбір трансформанта сої pDAB9582.814.19.1, що включає Cry1F і Cry1Ac

Трансгенна соя (*Glycine max*), що містить трансформант pDAB9582.814.19.1, була створена в результаті опосередкованої *Agrobacterium* трансформації експлантатів сім'ядольного вузла сої. Для ініціації трансформації був використаний штам *Agrobacterium* EHA101 без плеча хромосоми (Hood et al., 1993), який містить подвійний вектор pDAB9582 (фіг. 1) з селектованим маркером *pat v6* і генами *cry1F v3* і *cry1Ac*, які представляють інтерес, в області Т-ланцюга ДНК. Послідовність ДНК для вектора pDAB9582 приведена в SEQ ID NO:3, яка представлена в таблиці 1.

Таблиця 1

Елементи генів, локалізовані у векторі pDAB9582

Пари основ (SEQ ID NO:3)	Елемент конструкції	Посилання
272-1593	Промотор AtUbi10	Callis, et al., (1990) J. Biol. Chem., 265: 12486-12493
1602-5048	Cry1F	Вищезгадане посилання
5151-5607	3' UTR ORF23	Патент США № 5428147
5671-6187	Промотор CsVMV	Verdaguer et al., (1996) Plant. Mol. Biol., 31: 1129-1139
6197-9667	Cry 1Ac	Вищезгадане посилання
9701-10157	3' UTR ORF23	Патент США № 5428147
10272-10788	Промотор CsVMV	Verdaguer et al., (1996) Plant Mol. Biol., 31: 1129-1139
10796-11347	PAT	Wohllleben et al., (1988) Gene 70: 25-37
11450-12153	3' UTR ORF1	Huang et al., (1990) J. Bacteriol. 172: 1814-1822

Опосередкована *Agrobacterium* трансформація була виконана за допомогою модифікованого методу, описаного в публікації Zeng et al. (2004). Насіння сої (сорті Maverick) пророщували на базальному середовищі, сім'ядольні вузли видаляли і інфікували *Agrobacterium*. У середовище для утворення паростків, росту паростків і вкорінення додавали цефотаксим, тиментин і ванкомицин для видалення *Agrobacterium*. Для інгібування росту нетрансформованих паростків використовували глүфосинат. Відібрані паростки переносили в середовище для вкорінення, що забезпечує розвиток кореневої системи, і потім переносили в ґрунтову суміш для акліматизації паростків.

Верхівкове листя відібраних паростків забарвлювали глүфосинатом для скринінгу передбачуваних трансформантів. Досліджені паростки переносили в теплицю, залишали для акліматизації і забарвлювали листя глүфосинатом для підтвердження стійкості і виявлення передбачуваних трансформантів. Відбирали зразки досліджених рослин і виконували молекулярні аналізи для підтвердження наявності гена селектованого маркера і/або гена, який представляє інтерес. Рослини T₀ залишали в теплиці для самозапилення, в результаті чого було отримане насіння T₁.

Трансформант сої pDAB9582.814.19.1 був отриманий з незалежного трансформованого ізоляту. Рослини T₁ піддавали зворотному схрещуванню і використовували для інтрогресії в елітні сорти в подальших поколіннях. Даний трансформант був відібраний на основі унікальних

характеристик, таких як один інсерційний сайт, нормальне менделевське розщеплення, стійка експресія і чудова комбінація ефективності, що включає стійкість до гербіцидів і агрономічну продуктивність. У нижченаведених прикладах представлені дані, які були використані для дослідження трансформанта сої pDAB9582.814.19.1.

5 Приклад 2. Дослідження експресії білка в трансформанті сої pDAB9582.814.19.1

Були досліджені біохімічні властивості рекомбінантних білків Cry1F, Cry1Ac і PAT, експресованих в трансформантах сої 9582.814.19.1. Кількісний твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA) є біохімічним аналізом, відомим в даній галузі, який може бути використаний для дослідження біохімічних властивостей білків і підтвердження експресії вказаних білків в трансформанті сої 9582.814.19.1.

10 Приклад 2.1. Експресія білків PAT, Cry1F і Cry1Ac в тканинах рослин

З досліджуваних рослин виділяли зразки тканин сої, які використовували при виконанні аналізу експресії. Білок PAT був екстрагований з тканин рослини сої за допомогою фізіологічного розчину з фосфатним буфером, який містив детергент твін-20 (PBST), що включає 0,5 % бичачого сироваткового альбуміну (BSA). Тканину рослини центрифугували; водний супернатант збирали, при необхідності розбавляли відповідним буфером і аналізували за допомогою набору ELISA для білка PAT у вигляді сендвіча. Вказаний набір був використаний відповідно до протоколу, запропонованого виробником (Envirologix, Portland, ME). В результаті виконання даного аналізу був виміряний вміст експресованого білка PAT.

Білок Cry1F був екстрагований з тканин рослини сої за допомогою фізіологічного розчину з фосфатним буфером, який містив детергент твін-20 (PBST). Тканину рослини центрифугували; водний супернатант збирали, при необхідності розбавляли відповідним буфером і аналізували за допомогою набору ELISA для білка Cry1F у вигляді сендвіча. Вказаний набір був використаний відповідно до протоколу, запропонованого виробником (Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE). В результаті виконання даного аналізу був виміряний вміст експресованого білка Cry1F.

Білок Cry1Ac був екстрагований з тканин рослини сої за допомогою фізіологічного розчину з фосфатним буфером, який містив детергент твін-20 (PBST), що включає 0,5 % бичачого сироваткового альбуміну (BSA). Тканину рослини центрифугували; водний супернатант збирали, при необхідності розбавляли відповідним буфером і аналізували за допомогою набору ELISA для білка Cry1Ac у вигляді сендвіча. Вказаний набір був використаний відповідно до протоколу, запропонованого виробником (Strategic Diagnostics Inc., Newark, DE). В результаті виконання даного аналізу був виміряний вміст експресованого білка Cry1Ac.

Детектуючий аналіз виконували для дослідження стійкості експресії і успадкованості трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 як по вертикалі (між поколіннями), так і по горизонталі (між лініями в одному поколінні).

35 Приклад 2.2. Експресія білків Cry1F, Cry1Ac і Pat в тканинах рослин

У трансформанті сої 9582.814.19.1 були визначені рівні білків Cry1F, Cry1Ac і PAT. Розчинні білки, що екстрагуються, виділені з тканини листа сої, вимірювали за допомогою кількісного твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). У поколіннях з T2 до T6 експресія трансформанта 9582.814.19.1 була стійкою (без розщеплення) і порівнянню у всіх лініях. У таблиці 2 приведений середній рівень експресії трансгенних білків в трансформанті сої 9582.814.19.1.

Таблиця 2

Середній рівень експресії різних трансгенних білків в трансформанті сої pDAB9582.814.19.1

Рівень експресії різних білків (нг/см ²)			
Трансформант	Cry1F	Cry1Ac	PAT
Трансформант сої pDAB9582.814.19.1	133	17,4	12

45 Приклад 3. Клонування і дослідження послідовності ДНК у вставці і фланкуючих крайових областях трансформанта сої pDAB9582.814.19.1

Для дослідження і опису інсерційного сайту геномної ДНК була визначена послідовність фланкуючих крайових областей геномної Т-ДНК трансформанта сої pDAB9582.814.19.1. Було встановлено, що геномна послідовність трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 містить 1400 п. о. 5'-кінцевої фланкуючої крайової послідовності (SEQ ID NO:1) і 1398 п. о. 3'-кінцевої фланкуючої крайової послідовності (SEQ ID NO:2). Ампліфікація методом ПЛР на основі крайових послідовностей трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 показала, що крайові області

належать сої і з'єднувальні області являють собою унікальні послідовності трансформанта сої рDAB9582.814.19.1. З'єднувальні області можуть бути використані для трансформантспецифічної ідентифікації трансформанта сої рDAB9582.814.19.1. Також був досліджений інсерційний сайт Т-ланцюга шляхом ампліфікації геномного фрагмента, відповідного області ідентифікованих фланкуючих крайових послідовностей з генома нетрансформованої сої. Порівняння трансформанта сої рDAB9582.814.19.1 з нетрансформованою геномною послідовністю показало, що в процесі інтеграції Т-ланцюга з вихідного локусу було видалено приблизно 57 п. о. Дослідження вставки і крайової послідовності трансформанта сої рDAB9582.814.19.1 показало, що в геномі сої присутня інтактна копія Т-ланцюга з рDAB9582.

Таблиця 3

Список праймерів і їх послідовностей, використаних для підтвердження геномної ДНК сої в трансформанті рDAB9582.814.19.1

SEQ ID NO:	Назва праймера	Розмір (п. о.)	Послідовність (від 5' до 3')	Мета
SEQ ID NO:4	81419_FW3	30	TTTCTCCTATCCGTCAAA	підтвердження 5' крайової геномної ДНК з використанням AtUbi10RV1 або RV2; 5'IREnd-01 або 5'IREnd-02
SEQ ID NO:5	81419_RV1	27	GGGTGATTTGGTGCCAAAAGTT ATGTT	підтвердження 3' крайової геномної ДНК з використанням 3'PATEnd05 або 3'PATEnd06
SEQ ID NO:6	81419_RV2	24	TGGAGGGTCATATCGCAAAAGA CT	підтвердження 3' крайової геномної ДНК з використанням 3'PATEnd05 або 3'PATEnd06
SEQ ID NO:7	81419_RV3	24	GTTCTGCGTCGTGGAGGGTCAT AT	підтвердження 3' крайової геномної ДНК з використанням 3'PATEnd05 або 3'PATEnd06
SEQ ID NO:8	5'IREnd-01	29	CGAGCTTTCTAATTTCAAACSTAT TCGGGC	підтвердження 5' крайової геномної ДНК з використанням 81419_FW3
SEQ ID NO:9	5'IREnd-02	30	TCCTAGATCATCAGTTCATACAA ACCTCCA	підтвердження 5' крайової геномної ДНК з використанням 81419_FW3
SEQ ID NO:10	AtUbi10RV1	29	CGGTCCTAGATCATCAGTTCATA CAAACC	підтвердження 5' крайової геномної ДНК з використанням 81419_FW3
SEQ ID NO:11	AtUbi10RV2	28	CACTCGTGTTTCAGTCCAATGAC CAATAA	підтвердження 5' крайової геномної ДНК з використанням 81419_FW3
SEQ ID NO:12	3'PATEnd05	20	GCTCCTCCAAGGCCAGTTAG	підтвердження 3' крайової геномної ДНК з використанням 81419_RV1, RV2 або RV3
SEQ ID NO:13	3'PATEnd06	20	CCAGTTAGGCCAGTTACCCA	підтвердження 3' крайової геномної ДНК з використанням 81419_RV1, RV2 або RV3

Таблиця 4

Умови ампліфікації стандартним методом ПЛР крайових областей
і трансформантспецифічних послідовностей трансформанта сої pDAB9582.814.19.1

Послідовність-мішень	Набір праймерів	Суміш для ПЛР	Попередня денатурація (°C/хв.)	Денатурація (°C/сек.)	Подовження (°C/хв.:сек.)	Кінцеве подовження (°C/хв.)
5' крайова	81419_FW3/AtUbi10RV1	D	95/3	98/10	68/4:00	71/10
				32 цикли		
5' крайова	81419_FW3/5'IREnd-01	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 цикли		
3' крайова	3'PATEnd05/81419_RV2	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				35 циклів		
3' крайова	3'PATEnd05/81419_RV3	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				35 циклів		
3' крайова	3'PATEnd06/81419_RV2	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				35 циклів		
3' крайова	3'PATEnd06/81419_RV3	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 цикли		
Локус вставки	81419_FW3/81419_RV3	D	95/3	98/10	68/4:00	72/10
				32 цикли		

Таблиця 5

Суміш для ПЛР, призначена для ампліфікації стандартним методом ПЛР крайових областей і трансформантспецифічних послідовностей в трансформанті сої pDAB9582.814.19.1			
Суміш А для ПЛР		Суміш В для ПЛР	
Реагент	1-кратна реакційна суміш (мкл)	Реагент	1-кратна реакційна суміш (мкл)
H ₂ O	0,8	H ₂ O	14,6
суперсуміш ACCPRIME PFX	20	10-кратний буфер LA TAQ	2
-	-	MgCl ₂ (25 мМ)	0,6
-	-	dNTP (2,5 мкМ)	1,6
праймер 10 мкМ	0,2	праймер 10 мкМ	0,1
фермент, що розщеплює гДНК	1	фермент, що розщеплює гДНК	1
-	-	LA Taq (50 од./мкл)	0,1
загальний об'єм:	22	загальний об'єм:	20
Суміш С для ПЛР		Суміш D для ПЛР	
Реагент	1-кратна реакційна суміш (мкл)	Реагент	1-кратна реакційна суміш (мкл)
H ₂ O	28	H ₂ O	11,6
10-кратний буфер II для ПЛР (з магнієм)	5	10-кратний буфер II для ПЛР (з магнієм)	2
MgCl ₂ (25 мМ)	1,5	MgCl ₂ (25 мМ)	0,6
dNTP (2,5 мМ)	8	dNTP (2,5 мМ)	3,2
адапторний праймер для ПЛР (10 мкМ)	1	праймер 1 (10 мкМ)	0,4
Вкладений праймер GOI (10 мкМ)	1	праймер 2 (10 мкМ)	0,4
ДНК-зв'язані гранули	5	матриця ДНК	0,2
La Taq (5 од./мкл)	0,5	La Taq (5 од./мкл)	1,6
загальний об'єм:	50	загальний об'єм:	20

Приклад 3.1. Підтвердження геномних послідовностей сої

5'- і 3'-фланкуючі крайові послідовності порівнювали з повною непроцесованою геномною послідовністю *Glucine max* з хромосоми 02, в результаті чого було встановлено, що трансген трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 вставлений в хромосому 02 генома сої. Для підтвердження інсерційного сайту трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 в геномі сої була виконана ПЛР з використанням різних пар праймерів (фіг. 2, таблиця 3, таблиця 4 і таблиця 5). Геномна ДНК з трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 і інших трансгенних або нетрансгенних ліній сої була використана як матриця. Для підтвердження правильності 5'-кінцевих крайових послідовностей був створений праймер, що зв'язується з генним елементом промотору AtUbi10, таким як, наприклад, AtUbi10RV1, і праймер, що зв'язується з клонованою 5'-кінцевою крайовою послідовністю в хромосомі 02 генома сої, що визначається як 81419_FW3, які були використані для ампліфікації сегмента ДНК в положенні від генного елемента промотора AtUbi10 до 5'-кінцевої крайової послідовності. Аналогічним чином для підтвердження клонованої 3'-кінцевої крайової послідовності був створений специфічний праймер rat, наприклад, 3' PATEnd05, і три праймери, які відповідають клонованій 3'-кінцевій крайовій послідовності, що визначаються як 81419_RV1, 81419_RV2 і 81419_RV3, які були використані для ампліфікації сегментів ДНК від гена rat до 3'-кінцевої крайової послідовності. Фрагменти ДНК передбачуваного розміру були ампліфікували тільки з геномної ДНК трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 при використанні кожної пари праймерів і не були ампліфіковані із зразків ДНК інших ліній трансгенної сої або нетрансгенного контрольного зразка. Отримані результати показують, що клоновані 5'- і 3'-кінцеві крайові послідовності є фланкуючими крайовими послідовностями вставки трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 в Т-ланцюгу.

Для подальшого підтвердження інсерції ДНК в геном сої методом ПЛР ампліфікували крайові послідовності сої в геномній ДНК, в яких була відсутня вставка трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 в Т-ланцюгу. Для ампліфікації сегментів ДНК, що містять локус з вбудованим Т-ланцюгом pDAB9582, був створений праймер 81419_FW3, що відповідає 5'-кінцевій крайовій послідовності, і один праймер 81419-RV3, призначений для 3'-кінцевої крайової послідовності. Як і очікувалося, в результаті ампліфікації методом ПЛР пари праймерів 81419_FW3 і 81419_RV3 дозволили отримати фрагмент ДНК довжиною приблизно 1,5 т.п.о. у всіх інших контрольних лініях сої за винятком pDAB9582.814.19.1. Порівняння ідентифікованих 5'- і 3'-кінцевих крайових послідовностей трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 з повною непроцесованою геномною послідовністю *Glucine max* з хромосоми 02 виявило делецію з вихідного локусу приблизно 57 п. о. (фіг. 3). Отримані результати показали, що трансген трансформанта сої pDAB8294 був введений в сайт хромосоми 02 генома сої.

Приклад 4. Дослідження трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 методом саузерн-блоттингу

Аналіз методом саузерн-блоттингу був виконаний для визначення паттерна інтеграції трансформанта сої pDAB9582.814.19.1. В результаті виконаних експериментів були отримані дані, що свідчать про інтеграцію і цілісність трансгенів *cry1Ac* і *cry1F* в геномі сої. Трансформант сої pDAB9582.814.19.1 являв собою повний, простий інтеграційний трансформант, що містить одну копію PTU *cry1Ac* і *cry1F* з плазмиди pDAB9582.

Дані, отримані в результаті виконання саузерн-блоттингу, показали, що в геном трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 був введений фрагмент Т-ланцюга. Детальний аналіз методом саузерн-блоттингу був виконаний з використанням зондів, специфічних до генів *cry1Ac* і *cry1F*, що знаходилися в області інтеграції трансформанта pDAB9582.814.19.1 в Т-ланцюгу, і дескриптивних рестрикційних ферментів, які мають сайти розщеплення в плазміді і продукують гібридизуючі фрагменти всередині плазмиди або фрагменти, що заповнюють місце з'єднання плазмиди з геномною ДНК сої (крайові фрагменти). Молекулярна маса, встановлена в результаті гібридизації методом саузерн-блоттингу для комбінації рестрикційного ферменту і зонда, була унікальною для даного трансформанта і визначала його ідентифікуючі паттерни. Вказані аналізи також показали, що фрагмент плазмиди був введений в геномну ДНК сої без реаранжування PTU *cry1Ac* і *cry1F*.

Приклад 4.1. Отримання зразка листа сої і виділення геномної ДНК (гДНК)

Геномну ДНК екстрагували з тканини листа окремих рослин сої, які містять трансформант pDAB9582.814.19.1. Крім того, гДНК була виділена зі стандартної рослини сої сорту *Maverick*, генетичний фон якого типовий для даної лінії з відсутністю генів *cry1Ac* і *cry1F*. Геномну ДНК екстрагували з ліофілізованої тканини листа стандартним методом СТАВ (Sambrook et al. (1989)). Екстраговану ДНК піддавали кількісному спектрофлуориметричному аналізу, використовуючи реагент Pico Green (Invitrogen, Carlsbad, CA). Потім ДНК візуалізували на

агарозному гелі для підтвердження результатів аналізу з використанням реагенту Pico Green і визначення якості ДНК.

Приклад 4.2. Розщеплення і виділення ДНК

Для молекулярного дослідження трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 методом саузерн-блоттингу розщеплювали десять мікрограмів (10 мкг) геномної ДНК. Геномну ДНК з трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 і лінії нетрансгенної сої сорту Maverick розщеплювали, додаючи до кожного зразка ДНК приблизно п'ять одиниць вибраного рестрикційного ферменту на один мкг ДНК і відповідний реакційний буфер. Кожний зразок інкубували протягом ночі приблизно при 37°C. Для окремих розщеплень використовували рестрикційні ферменти Asel, HindIII, NsiI і NdeI (New England Biolabs, Ipswich, MA). Для подвійного розщеплення одночасно використовували рестрикційні ферменти NotI і ApaLI (New England Biolabs, Ipswich, MA). Крім того, був отриманий позитивний контрольний гібридизований зразок шляхом об'єднання плазмідної ДНК, pDAB9582, з геномної ДНК нетрансгенної сої сорту Maverick. Суміш плазмідної ДНК/геномної ДНК розщеплювали такими ж методами з використанням такого ж рестрикційного ферменту, що і експериментальні зразки.

Розщеплену ДНК інкубували протягом ночі, додавали 25 мкл розчину QUICK-PRECIP PLUS (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD), після чого зразки розщепленої ДНК осаджували ізопропанолом. Осаджену ДНК ресуспендували в 15 мкл 1-кратного заповнюючого буфера (0,01 % бромфенолового синього, 10,0 mM EDTA, 10,0 % гліцерину, 1,0 mM тріс-буфера, pH 7,5). Зразки ДНК і маркери молекулярної маси піддавали електрофорезу в 0,85 % агарозному гелі, використовуючи 0,4-кратний буфер TAE (Fisher Scientific, Pittsburg, PA), під напругою 35 вольт протягом приблизно 18-22 годин для відділення фрагмента. Гелі забарвлювали бромідом етидію (Invitrogen, Carlsbad, CA) і ДНК візуалізували в ультрафіолетовому (УФ) світлі.

Приклад 4.3. Перенесення методом саузерн-блоттингу і обробка мембрани

Аналіз методом саузерн-блоттингу виконували відповідно до опису, приведенного в публікації Memelink, et al. (1994). Після відділення методом електрофорезу і візуалізації фрагментів ДНК гелі депуринізували 0,25 M HCl протягом приблизно 20 хвилин, занурювали в денатуруючий розчин (0,4 M NaOH, 1,5 M NaCl) приблизно на 30 хвилин і потім переносили в нейтралізуючий розчин (1,5 M NaCl, 0,5 M тріс-буфера, pH 7,5) щонайменше на 30 хвилин. Перенесення методом сайзерн-блоттингу на нейлонові мембрани виконували протягом ночі, використовуючи систему тампонів з 10-кратним розчином SSC. Перенесену ДНК зв'язували з мембраною шляхом перехресного зв'язування під впливом УФ-світла, після чого мембрану швидко промивали 2-кратним розчином SSC. В результаті виконання саузерн-блоттингу були отримані мембрани, готові для гібридизації.

Приклад 4.4. Мічення ДНК-зонда і гібридизація

Фрагменти ДНК, зв'язані з нейлоновою мембраною, виявляли за допомогою міченого зонда (таблиця 6). Зонди були отримані в результаті включення методом ПЛР нуклеотиду, міченого дигоксигеніном (DIG), [DIG-11]-dUTP, у фрагмент ДНК, ампліфікований з плазміди pDAB9582 за допомогою праймерів, специфічних до генних елементів. ДНК-зонди були створені шляхом синтезу методом ПЛР з використанням набору для синтезу DIG-мічених зондів методом ПЛР (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) відповідно до рекомендацій виробника.

Мічені зонди аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі для визначення їх якості і кількості. Потім необхідну кількість міченого зонда використовували для гібридизації з ДНК-мішенню на нейлонових мембранах з метою виявлення конкретних фрагментів методами, описаними для розчину, призначеного для простої гібридизації за допомогою DIG (DIG EASY HYB SOLUTION, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Блоти нейлонових мембран, які містять фіксовану ДНК, швидко промивали 2-кратним розчином SSC і попередньо гібридизували з 20-25 мл заздалегідь нагрітого розчину DIG EASY HYB SOLUTION в флаконах для гібридизації протягом приблизно 2 годин при температурі близько 45-55°C в гібридизуючій печі. Розчин для попередньої гібридизації потім декантували і замінювали ~15 мл попередньо нагрітого розчину DIG EASY HYB SOLUTION, що містить необхідну кількість специфічних зондів, денатурованих шляхом кип'ятіння на водяній бані протягом приблизно п'яти хвилин. Стадію гібридизації потім виконували протягом ночі при температурі близько 45-55°C в гібридизуючій печі.

У кінці гібридизації зондів розчини DIG EASY HYB SOLUTION, що містять зонди, декантували в чисті пробірки і зберігали при температурі близько -20 °C. Вказані зонди можуть бути використані двічі відповідно до рекомендацій виробника. Мембранні блоти швидко споліскували і двічі промивали в чистих пластикових ємностях промивальним буфером в умовах зниженої суворості (2-кратний об'єм SSC, 0,1 % SDS) протягом приблизно п'яти хвилин при кімнатній температурі і потім двічі промивали промивальним буфером в суворих умовах (0,1-кратний об'єм SSC, 0,1 % SDS) протягом 15 хвилин при температурі близько 65°C.

Мембранні блоти швидко промивали 1-кратним буфером з maleїновою кислотою з набору промивальних і блокуючих буферів DIG (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) протягом приблизно 5 хвилин. Потім виконували промивання 1-кратним блокуючим буфером протягом 2 годин і інкубували з антитілом проти DIG-AP (лужна фосфатаза) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) в 1-кратному блокуючому буфері також протягом мінімум 30 хвилин. Після 2-3 промивань 1-кратним промивальним буфером специфічні ДНК-зонди залишалися зв'язаними з мембранними блотами, після чого DIG-мічену еталонну ДНК візуалізували за допомогою хемілюмінесцентної системи виявлення нуклеїнової кислоти CDP-STAR (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) відповідно до рекомендацій виробника. Блоти піддавали впливу хемілюмінесцентної плівки протягом одного або декількох разів для виявлення гібридизуючих фрагментів і візуалізації молекулярних еталонів. Плівки проявляли в проявнику плівок ALL-PRO 100 PLUS (Konica Minolta, Osaka, Japan) і отримані зображення сканували. Для кожного зонда реєстрували число і розміри виявлених смуг. DIG-мічений маркер II молекулярної маси ДНК (DIG MWM II) і DIG-мічений маркер VII молекулярної маси ДНК (DIG MWM VII), видимий після виявлення DIG вищеописаним методом, були використані для визначення розміру гібридизуючих фрагментів на саузерн-блотах.

Таблиця 6

Локалізація і довжина зондів, використаних при виконанні аналізу методом саузерн-блоттингу

Назва зонда	Генетичний елемент	Довжина (п. о.)
Cry1Ac	cry1Ac	1720
Cry1F	cry1F	1746
specR	Ген стійкості до спектиноміцину	750
OriRep	Ori Rep	852
trfA	Білок ініціації реплікації trfA	1119

Приклад 4.5. Результати аналізу методом саузерн-блоттингу

У таблиці 7 приведені розміри передбачуваних фрагментів і фрагментів, отриманих для певного гідролізату і зонда на основі відомих сайтів рестрикційних ферментів PTU cry1Ac і cry1F. В результаті вказаних розщеплень і гібридизацій були ідентифіковані фрагменти двох типів: внутрішні фрагменти, де відомі сайти ферментів фланкують область зонда і повністю знаходяться в інсерційній області PTU cry1Ac і cry1F, і крайові фрагменти, де відомий сайт ферменту локалізований біля одного кінця області зонда і другий сайт знаходиться в геномі сої. Розміри крайових фрагментів змінюються залежно від трансформанта, оскільки в більшості випадків сайти інтеграції фрагментів ДНК є унікальними для кожного трансформанта. Крайові фрагменти являють собою засіб локалізації сайту рестрикційного ферменту відносно інтегрованої ДНК і визначення числа інсерцій ДНК. Аналізи методів саузерн-блоттингу, виконані в декількох поколіннях сої, що містить трансформант pDAB9582.814.19.1, дозволили отримати дані, з яких виходить, що в геном трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 була введена малокопійна інтактна PTU cry1Ac і cry1F з плазмиди pDAB9582.

Таблиця 7

Гібридизуючі фрагменти, прогнозовані і виявлені при виконанні аналізу методом саузерн-блоттингу

1. Розміри передбачуваних фрагментів визначені на основі плазмідної карти pDAB9582. 2. Розміри виявлених фрагментів встановлені приблизно за результатами вказаних аналізів і визначені на основі виявлених розмірів фрагментів DIG-міченого маркера II і маркера VII молекулярної маси ДНК

ДНК-зонд	Рестрикційні ферменти	Зразки	Розміри передбачуваних фрагментів (п. о.) ¹	Розміри виявлених фрагментів (п. о.) ²
		pDAB9582	13476	>14000
	Asel	Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.814.19.1	>7286	~7400
		pDAB9582	15326	>15000

Продовження таблиці 7

Cry1Ac	Nsil	Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.814.19.1	>9479	>10000
		pDAB9582	4550	~4500
	NotI+ApaI	Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.814.19.1	4550	~4500
		pDAB9582	8071	~8000
	NdeI	Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.814.19.1	5569	~7500
		pDAB9582	11044	11000
Cry1F	Nsil	Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.814.19.1	>9479	>10000
		pDAB9582	7732	~7700
	HindIII	Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.814.19.1	7732	~7700
		pDAB9582	15320	~15000
SpecR	Nsil	Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.814.19.1	немає	немає
		pDAB9582	15320	~15000
trfA	Nsil	Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.814.19.1	немає	немає
		pDAB9582	5239	~5000
oriREP	NdeI	Maverick	немає	немає
		Трансформант сої pDAB9582.814.19.1	немає	немає

Рестрикційні ферменти AseI і NsiI зв'язуються з унікальними сайтами рестрикції і розщеплюють їх в плазміді pDAB9582. Тому вказані ферменти були вибрані для дослідження вставки гена cry1Ac в трансформанті сої pDAB9582.814.19.1. Було передбачено, що крайові фрагменти >7286 п. о. або >9479 п. о. повинні гібридизувати із зондом після розщеплення ферментами AseI і NsiI (таблиця 7). Окремі смуги гібридизації cry1Ac близько 7400 п. о. і >10000 п. о. були виявлені при використанні відповідно AseI і NsiI. Гібридизація зонда зі смугами вказаного розміру дозволяє передбачити наявність одного сайту інсерції для гена cry1Ac в геномі трансформанта сої pDAB9582.814.19.1. Рестрикційні ферменти NotI і ApaI були вибрані для подвійного розщеплення і вивільнення фрагмента, що містить транскрипційну одиницю рослини cry1Ac (PTU, промотор/ген/термінатор) (таблиця 7). Прогнозовані фрагменти довжиною 4550 п. о. були виявлені за допомогою зонда після подвійного розщеплення ферментами NotI і ApaI. Результати, отримані при розщепленні ферментами зразків pDAB9582.814.19.1 з подальшою гібридизацією із зондом, показали, що в геномі трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 була введена інтактна PTU cry1Ac з плазміді pDAB9582.

Рестрикційні ферменти NdeI і NsiI зв'язуються з сайтами рестрикції і розщеплюють їх в плазміді pDAB9582. Тому вказані ферменти були вибрані для дослідження вставки гена cry1F в трансформант сої pDAB9582.814.19.1. Було передбачено, що крайові фрагменти >5569 п. о. і >9479 п. о. повинні гібридизувати із зондом після розщеплення ферментами NdeI і NsiI (таблиця 7). Окремі смуги гібридизації cry1F >7500 п. о. і >10000 п. о. були виявлені при використанні відповідно NdeI і NsiI. Гібридизація зонда з смугами вказаного розміру дозволяє передбачити наявність одного сайту інсерції для гена cry1F в геномі трансформанта сої pDAB9582.814.19.1. Рестрикційний фермент HindIII був вибраний для вивільнення фрагмента, що містить транскрипційну одиницю рослини cry1F (PTU, промотор/ген/термінатор) (таблиця 7). Прогнозований фрагмент довжиною 7732 п. о. був виявлений за допомогою зонда після

розщеплення ферментом HindIII. Результати, отримані при розщепленні ферментами зразків pDAB9582.814.19.1 з подальшою гібридизацією із зондом, показали, що в геном трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 була введена інтактна PTU cgy1F з плазмиди pDAB9582.

Приклад 4.6. Відсутність кістякових послідовностей

5 Аналіз методом саузерн-блоттингу був також виконаний для перевірки відсутності гена стійкості до спектиноміцину (specR), елемента OriRep і білка ініціації реплікації trfA (елемент trf A) в трансформанті сої pDAB9582.814.19.1. Передбачалася відсутність специфічної гібридизації з геном стійкості до спектиноміцину, елементом OriRep або елементом trfA при виконанні аналізу методом саузерн-блоттинг позитивного контрольного зразка (pDAB9582, введений в 10 геномну ДНК сорти Maverick) і негативного контрольного зразка (геномна ДНК сорти Maverick). Після розщеплення ферментом NsiI і гібридизації із зондом, специфічним до specR, в позитивному контрольному зразку (pDAB9582, введений в геномну ДНК сорти Maverick) була виявлена одна смуга передбачуваного розміру, яка дорівнює 15320 п. о. Зонд до specR не гібридизував з негативним контрольним зразком і зразком, що містить трансформант сої 15 pDAB9582.814.19.1. Аналогічним чином після розщеплення ферментом NsiI і гібридизації із зондом trfA в позитивному контрольному зразку (сорт Maverick, що містить pDAB9582) була виявлена одна смуга передбачуваного розміру, яка дорівнює 15320 п. о., яка була відсутня в негативному контрольному зразку і зразку, що містить трансформант сої pDAB9582.814.19.1. Після розщеплення ферментом NdeI і гібридизації із зондом, специфічним до OriRep, в 20 позитивному контрольному зразку (pDAB9582, введений в геномну ДНК сорти Maverick) була виявлена інша смуга передбачуваного розміру, яка дорівнює 5329 п. о., яка була відсутня в негативному контрольному зразку і зразку, що містить трансформант сої pDAB9582.814.19.1. Отримані дані свідчать про відсутність гена стійкості до спектиноміцину, елемента OriRep і білка ініціації реплікації trfA в трансформанті сої pDAB9582.814.19.1.

25 Приклад 5. Агрономічні і польові випробування і визначення стійкості до гербіцидів

Для дослідження агрономічних характеристик і ефективності трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 насіння, що містить вказаний трансформант, було посіяне на ділянку, 30 призначену для випробування ефективності, в Санта-Ізабель, Пуерто-Ріко, в жовтні 2010 р. і лютому 2011 р. Культивар Maverick, трансформований з можливістю продукування трансформанта pDAB9582.814.19.1, був посіяний в кожному розпліднику і використаний як контрольний зразок у вказаних експериментах. Насіння для розплідника T3 було отримане в результаті селекції однієї рослини на стадії T2, і насіння для розплідника T4 було отримане в результаті селекції однієї рослини на стадії T3. У кожному поколінні було випробувано чотири 35 лінії трансформанта. Кожну лінію висівали на дослідній ділянці шириною в 4 ряди і довжиною 229 см (7,5 фути). Відстань між рядами була така, що дорівнює 75 см (30 дюймів). Ділянки отримували додаткове освітлення протягом приблизно 2,5 тижня для компенсації короткого світлового дня в Пуерто-Ріко. Кожну ділянку обприскували глуфосинатом при нормі 411 г еквівалента кислоти/га. Одну ділянку з контрольними рослинами сорту Maverick обприскували такою ж кількістю глуфосинату, другу ділянку не обприскували і використовували як контрольну 40 ділянку для порівняння з трансформантом за даним винаходом.

Були отримані дані по схожості, зовнішньому вигляду, потужності, висоті, виляганню і дозріванню. Стійкість до гербіциду оцінювали візуально відносно хлорозу, некрозу листя і загибелі рослин (таблиця 8).

45 Для порівняння трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 з сортом Maverick використовували тільки дані, отримані для сорту Maverick, що не обприскується гербіцидом. Для порівняння ділянок, що не обприскуються, і ділянок, що обприскуються, використовували дані, отримані для трансформанта сої pDAB9582.814.19.1, що обприскується вказаним гербіцидом, які порівнювали з даними, отриманими для контрольної ділянки, що не обприскується, на якій була посіяна соя сорту Maverick. Трансформант сої pDAB9582.814.19.1 характеризувався стійкістю 50 до гербіциду глуфосинату. На відміну від цієї рослини сорти Maverick не були стійкі до впливу вказаного гербіциду.

Таблиця 8

Порівняння трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 з сортом Maverick. Приведені значення усереднені для розсадників Т3 і Т4. Кожний розсадник, в якому була посіяна соя, що містила трансформант pDAB9582.814.19.1, обприскували глүфосинатом на стадії V3 при нормі 411 г еквівалента кислоти/га

Трансформант	Схожість (%)	Зовнішній вигляд (від 1 = поганий до 9 = хороший)	Потужність (від 1 = погана до 9 = хороша)	Висота (см)	Вилягання (%)	Дозрівання (дні)
pDAB9582.814.19.1	90	8	8	69	1	91
Maverick	82	8	8	64	1	91

Приклад 6. Дослідження інсектицидної активності трансформанта сої pDAB9582.814.19.1

Активність Cry1Ac і Cry1F в трансформанті сої pDAB9582.814.19.1 досліджували в польових умовах і теплиці проти виведених в лабораторії шкідників сої, що включають *Anticarsia gemmatalis* (оксамитова гусениця), *Pseudoplusia includens* (соевий п'ядун) і *Spodoptera frugiperda* (совка трав'яна). Трансформант сої pDAB9582.814.19.1 порівнювали з нетрансформованою соєю сорту Maverick для визначення ступеня захисту рослин, що забезпечується білками Cry1F і Cry1Ac.

У теплиці досліджували рослини у віці приблизно чотирьох тижнів. Для оцінки трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 і контрольної сої сорту Maverick були використані п'ятнадцять рослин. Для кожного випробуваного виду комах (*Anticarsia gemmatalis*, *Pseudoplusia includens* і *Spodoptera frugiperda*) з кожної рослини було зрізано по 3 листки, в результаті чого зі всіх рослин було отримано загалом 45 листових дисків для кожного виду комах. Листові диски розміром 1,4 см (1,54 см²) вміщували зверху 2 % водного агару, заражали однією новонародженою личинкою і закривали перфорованою пластиковою кришкою. Загибель личинок і кількість з'їденого листка оцінювали через 4 дні після зараження. Личинки, які не реагували на обережний дотик щупом, вважалися мертвими. Пошкодження листка визначали шляхом візуальної оцінки з'їденої комахою частини листового диска в процентному обчисленні.

Для оцінки рослин, що виростили в польових умовах, збирали зразки листя з рослин, вирощених з насіння на дослідних ділянках в Санта-Ізабель, Пуерто-Ріко, і відправляли зібране листя на дослідження в Індіанополіс, шт. Індіана. Дослідна ділянка для трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 була засіяна в лютому 2011 р. і складалася приблизно з 180 рослин в чотирьох рядах. Кожний ряд був довжиною 2,3 м, і відстань між рядами була така, що дорівнює 76,2 см; окремі рослини виростили на відстані 5,1 см одна від одної в кожному ряду. У березні 2011 р. з 10 рослин сої, що містять трансформант pDAB9582.814.19.1, і з 10 рослин сорту Maverick було зрізано по одному повністю розвиненому трилиснику головного стебла, розташованому на відстані приблизно чотирьох вузлів нижче меристеми. Листя було вміщене в пластикові мішки з етикетками (по одному в кожний мішок) і запечатане. Листя в мішках було упаковане в коробки і відправлене в лабораторію. У лабораторії з кожного трилисника були виготовлені один або два листові диски з діаметром 3,33 см (1,31 дюйми), в результаті чого було отримано загалом 16 дисків. Кожний листовий диск вміщували зверху 2 % агару, заражали однією новонародженою личинкою *S. frugiperda* і закривали перфорованою пластиковою кришкою. Листові диски витримували в камері з контрольованим середовищем протягом 7 днів, протягом яких оцінювали загибель комах і кількість з'їденого листка. Личинки, які не реагували на обережний дотик щупом, вважалися мертвими. Пошкодження листя визначали шляхом візуальної оцінки з'їденої комахою частини листового диска в процентному обчисленні.

Результати, отримані в двох експериментах, показали, що листя, що містить трансформант сої pDAB9582.814.19.1, було значно менше пошкоджене всіма перевіреними комахами, ніж контрольні рослини сорту Maverick. Таким чином, трансформант сої pDAB9582.814.19.1 має інсектицидну активність відносно широкого спектра комах.

Приклад 7. Послідовність трансформанта сої pDAB9582.814.19.1

SEQ ID NO:14 являє собою послідовність трансформанта сої pDAB9582.814.19.1. Дана послідовність містить 5'-кінцеву геномну фланкуючу послідовність, вставку Т-ланцюга pDAB9582 і 3'-кінцеві геномні фланкуючі послідовності. У SEQ ID NO:14 залишки 1-1400 є 5'-кінцевою геномною фланкуючою послідовністю, залишки 1401-1536 є реаранжированими залишками плазмиди pDAB9582, залишки 1537-13896 є залишками вставки Т-ланцюга

pDAB9582 і залишки 13897-15294 є 3'-кінцевою фланкуючою послідовністю. З'єднувальна послідовність або перехід до 5'-кінця вставки, таким чином, знаходиться в положенні залишків 1400-1401 SEQ ID NO:14. З'єднувальна послідовність або перехід до 3'-кінця вставки, таким чином, знаходиться в положенні залишків 13896-13897 SEQ ID NO:14.

Потрібно зазначити, що потомство трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 може мати послідовності, дещо відмінні від SEQ ID NO:14. У процесі інтрогресії і селекції з введенням трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 в геном рослинних клітин можливі деякі делеції або інші зміни вставки. Крім того, в процесі ампліфікації методом ПЛР можуть виникнути помилки, які можуть викликати незначні помилки секвенування. Наприклад, фланкуючі послідовності, приведені в даному описі винаходу, були визначені шляхом створення ампліконів з геномних ДНК сої, після чого амплікони були клоновані і секвенувані. Цілком можливі невеликі відмінності і незначні розходження в послідовностях, створених і визначених подібним чином, з урахуванням численних циклів ампліфікації, необхідних для створення з геномних ДНК амплікона, достатнього для секвенування. Фахівцеві в даній галузі повинно бути зрозуміло, що в об'єм даного винаходу входять будь-які коректування, необхідні внаслідок виникнення звичайних помилок секвенування або розходжень вказаних типів. Таким чином, відповідний сегмент плазмідної послідовності за даним винаходом може включати деякі незначні зміни. У об'єм даного винаходу також входить рослина, що включає полінуклеотид, що має деякий ступінь ідентичності з вставковою послідовністю за даним винаходом. Полінуклеотидна послідовність може бути ідентична послідовності SEQ ID NO:14 щонайменше на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 %. Таким чином, деякі відмінності SEQ ID NO:14 від потомства рослин з трансформантом сої pDAB9582.814.19.1 можуть бути ідентифіковані і входять в об'єм даного винаходу.

Приклад 8. Трансформантспецифічний аналіз TaqMan

Трансформантспецифічний аналіз TAQMAN був розроблений для виявлення трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 і визначення статусу зиготності рослин в популяції, достатньої для подальшого розмноження. Трансформант сої pDAB9582.814.19.1 містить T-ланцюг подвійного вектора pDAB9582 (фіг. 1). Для виявлення трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 були створені специфічні праймери і зонди TAQMAN, відповідні послідовностям ДНК, розташованим в місці 5'-кінцевого (SEQ ID NO:1) або 3'-кінцевого (SEQ ID NO:2) з'єднання вставки з геномом рослини (фіг. 4). Один трансформантспецифічний аналіз трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 спеціально призначений для виявлення фрагмента ДНК довжиною 229 п. о., що заповнює місце інтеграції в положенні 3'-кінця, і включає використання двох праймерів специфічного до мішені зонда MGB, що містить ген-репортер FAM в положенні 5'-кінця, який був синтезований в компанії Applied Biosystems (ABI). Специфічність методу TAQMAN, призначеного для виявлення трансформанта сої pDAB9582.814.19.1, досліджували відносно 7 різних трансформантів, що містять PTU Cry1Ac і Cry1F, і контрольного сорту нетрансгенної сої (Maverick) в подвійному форматі зі специфічним ендogenous еталонним геном сої GMFL01-25-J19 (кДНК Glycine max, GenBank: AK286292.1).

Приклад 8.1. Виділення гДНК

У даному експерименті були досліджені зразки гДНК 7 різних трансформантів сої і сортів нетрансгенної сої. Геномну ДНК екстрагували, використовуючи модифікований набір для екстракції ДНК рослин QIAGEN MAGATTRACT (Qiagen, Valencia, CA). гДНК екстрагували з листових дисків свіжої сої, по 8 на кожний зразок. Відповідно до цілей даного дослідження зразки розводили водою без ДНКази з досягненням концентрації, яка дорівнює приблизно 10 нг/мкл.

Приклад 8.2. Аналіз TaqMan і результати

Специфічні праймери і зонди, використані при виконанні аналізу методом TAQMAN, були створені спеціально для трансформанта сої pDAB9582.814.19.1, що досліджується методом TAQMAN. Вказані реагенти можуть бути використані в приведених нижче умовах для виявлення трансгена в трансформанті сої pDAB9582.814.19.1. У таблиці 9 приведені послідовності праймерів і зондів, які були створені спеціально для виявлення трансформанта сої pDAB9582.814.19.1.

Таблиця 9

Праймери і зонди для ПЛР методом TAQMAN

Взаємодія з трансформантом-мішенню			
	Назва	Опис	Послідовність
SEQ ID NO:15	81419_3'F	Трансформант-специфічний верхній праймер	TATGCATAGATGCACTCGAAATCA
SEQ ID NO:16	81419_3'R	Трансформант-специфічний нижній праймер	GTTTCCACACCCTAGATCCGTATC
SEQ ID NO:17	81419_3'P	Трансформант-специфічний зонд, що використовується з праймерами 81419_3'F і 81419_3'R	5'FAM/CCGCAATATGATATTCA-MGB

Взаємодія з еталонним геном-мішенню			
	Назва	Опис	Послідовність
SEQ ID NO:18	GMS116F	Верхній праймер	GTAATATGGGCTCAGAGGAATGGT
SEQ ID NO:19	GMS116R	Нижній праймер	ATGGAGAAGAACATTGGAATTGC
SEQ ID NO:20	Зонд GMS116	Зонд	5'HEX/CCATGGCCCGGTACCATCTGGTC/3BHQ_1/3'

Ампліфікація методом ПЛР була виконана в наступних умовах: 1-кратний буфер для ПЛР компанії Roche, 0,4 мкМ трансформантспецифічного верхнього праймера, 0,4 мкМ трансформантспецифічного нижнього праймера, 0,4 мкМ праймера GMS116F, 0,4 мкМ праймера GMS116R, 0,2 мкМ трансформантспецифічного зонди, 0,2 мкМ зонда GMS116, 0,1 % PVP, 6-20 нг гДНК в загальній кількості реакційної суміші, що дорівнює 10 мкл. Суміш ампліфікували в наступних умовах: i) 95°C протягом 10 хвилин, ii) 95°C протягом 10 секунд, iii) 60°C протягом 40 секунд, iv) повторення стадій ii-iii протягом 40 циклів, v) витримування при 40°C. ПЛР в реальному часі виконували в пристрої LIGHTCYCLER 480 компанії Roche. Аналіз даних був зроблений на основі вимірювання точки перетину (значення C_p), що визначається за допомогою програмного забезпечення LIGHTCYCLER 480, яка відповідає числу циклів ПЛР, при якому інтенсивність зміни флуоресценції досягає максимуму.

Метод TAQMAN, призначений для виявлення трансформанта сої pDAB9582.814.19.1, досліджували відносно 7 різних трансформантів, що містять PTU Cry1Ac і Cry1F, і сорти нетрансгенної сої в подвійному форматі зі специфічним ендogenousним еталонним геном сої GMFL01-25-J19 (GenBank: AK286292.1). Вказаний аналіз дозволяв специфічно виявляти трансформант сої pDAB9582.814.19.1 без яких-небудь помилкових позитивних результатів виявлення контрольних зразків (тобто трансформанти, що містять PTU Cry1Ac і Cry1F, і сорт нетрансгенної сої). Для виявлення трансформанта сої pDAB9582.814.19.1 можуть бути використані трансформантспецифічні праймери і зонди, причому вказані умови і реагенти застосовні для аналізів зиготності.

З урахуванням проілюстрованих і описаних принципів даного винаходу фахівцям в даній галузі повинно бути зрозуміло, що у винахід можуть бути внесені зміни, які не виходять за межі таких принципів. Всі модифікації заявленого винаходу знаходяться в межах суті і об'єму прикладеної формули винаходу.

Всі приведені публікації і опубліковані патентні документи включені в даний опис винаходу як посилання в тій мірі, в якій обґрунтоване включення як посилання кожної окремої публікації або заявки на патент.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Dow Agrosciences LLC

<120> СПОСІБ ВІЯВЛЕННЯ ТРАНСФОРМАНТА СОЇ pDAB9582.814.19.1

<130> 71235

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1836

<212> ДНК

<213> Соя Glycine max

<400> 1

ttaacaatga ccaagattta tgctatatag aagacttgga gggcttaagg ctatgatata	60
ttatggatga tatggttctg atttgtgtag tttcgaagga tcaaatcaac catttggttg	120
tacaatggga agaaaaaatg ttttcatcat tccactctat tgaaaaagat ccaacaattg	180
taacaccccg acgaatcaca ccggaagag aagaatccaa agattgtgta ggtatgagac	240
tgtatagttg atgaaaactt aaaaaaatta attggtacta cttataccaa caagatgcat	300
atatttttcg atagcctatc acataagaac ttcatagtta aggggtgctta acttgagta	360
gttatgaaat gagtgcctt ttaaaataat tattgtctta gggtattgta tgaaaaataa	420
aaataataat aaatatacat aaaaaataat aattttataa aattaacctt atattatcat	480
taatttattt ttagattttg ttattcatta ttaatatatg aggtataaat gaaaaatata	540
attaatgtca cattaaaaaa ttaaatgat aattattttg aaacaaatta tttattttta	600
tacgacaatt ataatagaaa ttgagagta aaaaaaatt gaaaattcat aaaatatatg	660
aatatattca tttctcctat ccgtcaaata aatctgctcc ataatttatac taagcattgg	720
tcttgtagtt cagagtaata aaattttagc aattattagt tagtacagat acatttaaag	780
aaataatata ttttagcaac tagaagttaa taaaaagttt taaattataa agacttatat	840
ataaatttag taaaactaga tggatgtccc aagtaatttt tatataacta ttctcgtaca	900
acattaatga aaatcttggt tctattattt atatgtatat tattatttta ttttggaaaca	960
atatgggatt aaaaactctt ataaattaaa tcttagaata agttttccta acatgttttt	1020
tttatggatg ttttctaac atgtttgggt atcttagttt tgctttaatt ttgtcggatt	1080
atttttggac tttattaggt aattttgata aaacttttag ttgatgtag tagtttactc	1140
ttacataatg atttgatatt gaatgtgtat aattggaagg caataaatga agatcaagcg	1200
tacaagagtt cgccaatcaa gaggatttga agagagtaaa atattatgcg aagtcccatg	1260
tgaagaaaat ccaaccattg gaataaaaaa taaagttttt tctttggaat tgctaagtct	1320
acagcactta ttggtacttg tcctaaaaat gaaactctag ctatatttag cacttgatat	1380

tcataaatca aactttctta tgaaataacc gcggtgcgca tgggtgcctg ttgatccccg	1440
gcaagttggg atcttgaagc aagttccgct catcactaag tggcttagca tgtttgacct	1500
tctcggacaa ctctttcttc tctttaattg atcaacagtc agcatcatca caccaaaaagt	1560
taggccccga tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcgct	1620
cttagccgta caatattact caccggatcc taaccggtgt gatcatgggc cgcgattaaa	1680
aatctcaatt atatttggtc taatttagtt tgggtattgag taaaacaaat tcggcgccat	1740
gcccgggcaa gcgccgcac aagtttgtac aaaaaagcag gctccgcggt gactgactga	1800
aaagcttgct gacctgcagg tcaacggatc aggata	1836

<210> 2
 <211> 1550
 <212> ДНК
 <213> Соя Glycine max

<400> 2	
gcacatagac acacacatca tctcattgat gcttggtaat aattgtcatt agattgtttt	60
tatgcataga tgcactcgaa atcagccaat tttagacaag tatcaaagg atgtgacttc	120
agtacattaa aaacgtccgc aatatgatat tcattaattt tatattatct aaaagagtta	180
aaagagaaaa aagaaatatg acaatttttt tctttcacat cttctaacct aaaagtatga	240
ctctatggag gctaagtta gaaaagata cggatctagg gtgtggaaac atcaatggtc	300
aactcctttt atatttcaat caattgggtt ttgctttatc ttacattttt ctctttttat	360
tttccacgtc tattcaaac tacttgtag cggttgatta ctcttttttc ttttatagat	420
gccattatt tctctctat gtattaaatt agagtatatt gtcttgaaag tgacttagta	480
ttttagttta tagtctctta aagaacgaca ctttttattc ttaactctct ttatcaagtt	540
ttaattttaa attattttta attaatgatg catacatatc ttaatatatt tcttaattat	600
ttttaaatc cctaaattta atgttttcat acaatgtaag agatatacat attaatata	660
tttaaagata aaacttactt tcttgcaata aaataaagaa aaggacagtc atacaattat	720
ataattaatc cagaatattt atagctttta aacatttatt ttctatcaat taagtaataa	780
ctttaaataa aattaagagt acttttttat actccaaaga atttatttat tttcaacaaa	840
atcgtctgac tgttttcaatt gatcattatc agcctagcat aacctaaatt tcattttcaa	900
acataacttt tggcaccaaa tcaccgggca ttgcaaaaaa gtcttttgcg atatgacct	960
ccacgacgca gaaccactgt tattcattac catcactttt aatcctaatt tcccatcac	1020
ttaccctttc catgacatct tcaaagcctt tattttgctt ttcttgttta agctgtttta	1080
acctaatctc atgcatataa acaaagagta aagcaaaggc aaatatttgt acgtatagtt	1140
tttagacaga aaaggaaagt aaattataga gataatgaag ttgctctttt taaattcgtc	1200
gtgatgttat ccatcatatc taaatgctta ttctgtttt tgtctttttt ctcttttacc	1260

ggagttttatt ttatataatt aattaaagtt agtagatcta tattcttttt catagataat	1320
ccatcttctt tggaggcaca tcgatcatta atcatagagt tttgagaagc attatcacta	1380
aagcttcaat taattatata caataaacgg tattggtgta tgatgttatg atagcaaata	1440
gataatctaa tctatacgag ccacaaaagg ggcatagaact ctatctcgaa gaaattggag	1500
atgaagggat tgagattggc accttggtgct attattgccc actaatcatt	1550

<210> 3
 <211> 12381
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Плазмідна послідовність вектора pDAB9582

<400> 3	
agtcagcatc atcacacca aagttaggcc cgaatagttt gaaattagaa agctcgcaat	60
tgagggtctac aggccaaatt cgctcttagc cgtacaatat tactcaccgg atcctaaccg	120
gtgtgatcat gggccgcat taaaaatctc aattatattt ggtctaattt agtttggtat	180
tgagtaaaac aaattcggcg ccatgcccg gcaagcggcc gcacaagttt gtacaaaaaa	240
gcaggctccg cggtgactga ctgaaaagct tgtcgacctg caggtaacg gatcaggata	300
ttcttgttta agatgttgaa ctctatggag gtttgatga actgatgatc taggaccgga	360
taagttccct tcttcatagc gaacttattc aaagaatgtt ttgtgatca ttcttgttac	420
attgttatta atgaaaaat attattggtc attggactga acacgagtgt taaatatgga	480
ccaggcccca aataagatcc attgatatat gaattaaata acaagaataa atcgagtcac	540
caaaccactt gcctttttta acgagacttg ttcaccaact tgatacaaaa gtcattatcc	600
tatgcaaata aataatcata caaaaatata caataacact aaaaaattaa aagaaatgga	660
taatttcaca atatgttata cgataaagaa gttacttttc caagaaattc actgatttta	720
taagcccact tgcattagat aaatggcaaa aaaaaacaaa aaggaaaaga aataaagcac	780
gaagaattct agaaaatacg aaatacgctt caatgcagtg ggaccacagg ttcaattatt	840
gccaattttc agctccaccg tatattttaa aaataaacg ataattgctaa aaaaatataa	900
atcgtaacga tcgttaaata tcaacggctg gatcttatga cgaccgtag aaattgtggt	960
tgtcgacgag tcagtaataa acggcgtcaa agtgggtgca gccggcacac acgagtcgtg	1020
tttatcaact caaagcacia atacttttcc tcaacctaaa aataaggcaa ttagccaaaa	1080
acaactttgc gtgtaaacaa cgctcaatac acgtgtcatt ttattattag ctattgcttc	1140
accgccttag ctttctcgtg acctagtcgt cctcgtcttt tcttcttctt cttctataaa	1200
acaataccca aagcttcttc ttcacaattc agatttcaat ttctcaaaat cttaaaaaact	1260
ttctctcaat tctctctacc gtgatcaagg taaatttctg tgttccttat tctctcaaaa	1320

tcttcgattt tgttttcggt cgatcccaat ttcgtatatg ttctttgggt tagattctgt	1380
taatcttaga tcgaagacga ttttctgggt ttgatcggtta gatatcatct taattctcga	1440
ttagggtttc ataaatatca tccgatttgt tcaaataatt tgagttttgt cgaataatta	1500
ctcttcgatt tgtgatttct atctagatct ggtgttagtt tctagtttgt gcgatcgaat	1560
ttgtcgatta atctgagttt ttctgattaa cagagatctc catggagAAC aatatccaga	1620
accagtgtgt cccatacaat tgcctcaaca atcctgaagt tgagatcctc aacgaagaga	1680
ggagcactgg acgccttccc cttgacatct cctctctcct cacaagggtc cttttgtctg	1740
agtttgttcc tgggtgtgggt gtggcctttg gcctctttga cctcatctgg ggcttcatca	1800
ccccatctga ttggagcctc ttccttctcc agattgaaca attgattgag cagaggattg	1860
agacccttga aaggaacaga gccatcacca cacttcgtgg ccttgctgac agctatgaaa	1920
tctacattga agcactccgt gagtgggaag ccaatcccaa caatgctcaa ctccgtgaag	1980
atgtgaggat tcgctttgcc aacacagatg acgctttgat cacagccatc aacaatttca	2040
ccctcaccag ctttgagatc cctttgctct cagtctatgt tcaagctgca aacctccact	2100
tgagcttgct tagggatgct gtgtccttcg gacaagggtg gggacttgac atagccactg	2160
tcaacaatca ctacaacaga ctcatcaact tgattcatcg ctacaccaaa cattgcttgg	2220
acacctacaa tcaaggattg gagaacctca gaggcaccaa cactcgccaa tgggcaagggt	2280
tcaaccagtt tagaagggat ctcaactca ctgtgcttga catagttgct ctcttcccca	2340
actatgatgt tcgcacctac ccaattcaaa ccagctccca acttacaagg gaaatctaca	2400
cctcctcagt cattgaggac agcccagttt ctgccaatat acccaatgggt ttcaaccgtg	2460
ctgagtttgg tgtcagacca ccccatctca tggacttcat gaactccttg tttgtgactg	2520
ccgagactgt taggtcccaa actgtgtggg gagggcacct tgttagctcc cgcaacaccg	2580
ctggcaaccg catcaacttc ccacctatg gggttttcaa tcctgggtgga gccatctgga	2640
ttgcagatga ggaccaaggt cctttctaca gaacctgtc agatcctgtc tttgtcagag	2700
gaggctttgg caatccacac tatgttcttg gtttgagggg agtggctttt cagcagactg	2760
gcaccaatca caccgcaca ttcagaaaca ggggcacat tgacagcctt gatgagatcc	2820
cacctcaaga caacagcgga gcacctgga acgactactc ccatgtgtc aatcatgtca	2880
cctttgtgcg ctggcctgggt gagatcagcg gttcagattc ttggagagca ccaatgttct	2940
catggacceca tcgctctgcc acaccacaa acaccattga tccagagaga atcaccacga	3000
ttcccttgggt gaaggcacac acacttcagt ctggaaccac agttgtcaga gggcctgggt	3060
tcactggtgg agacattctc agacgcacct ctggagggcc atttgcttac accattgtca	3120
acatcaatgg gcaacttccc cagcgttacc gtgccagaat ccgctatgct tccaccacta	3180
acttgagaat ctatgtcaca gttgctggtg aaaggatctt tgctggtcag ttcaacaaga	3240

caatggacac	tggtgatcca	ttgacattcc	agtcattctc	ctatgccacc	atcaacactg	3300
cattcacctt	tccaatgagc	cagtccagct	tcacagtggg	tgagataacc	ttcagctccg	3360
gcaatgaggt	gtacattgac	cgctttgagt	tgattccagt	gactgccaca	cttgaggctg	3420
agtctgactt	ggagcgtgct	cagaaggccg	tgaatgctct	cttcacctct	tcaaatcaga	3480
ttgggctcaa	gacagatgtg	actgactacc	atatagaccg	tgtttccaat	cttggtgagt	3540
gcctctctga	tgagttctgc	ttggatgaga	agaaagagtt	gtcagagaag	gtcaagcacg	3600
ccaagaggct	ctctgatgag	aggaacttgc	ttcaagatcc	caacttcaga	gggatcaacc	3660
gtcaattgga	tcgtggatgg	aggggatcaa	ctgacataac	cattcaagga	ggtgacgatg	3720
tgttcaagga	gaactatgtc	acactcttgg	ggaccttga	tgagtgttac	ccaacatacc	3780
tttaccagaa	gatagacgaa	agcaagctca	aggcctacac	aagataccag	ttgagagggt	3840
acattgagga	ctctcaagac	cttgaaatct	acctcatcag	atacaacgcc	aaacatgaga	3900
cagtcaatgt	gcctgggact	ggttcactct	ggccactttc	agccccaagc	cccattggca	3960
agtgtgcca	tcactcacat	cacttctcct	tggacataga	tgttggctgc	actgacttga	4020
atgaggacct	tggtgtgtgg	gtgatcttca	agatcaagac	ccaagatggc	catgcaagg	4080
tgggcaatct	tgagtttctt	gaagagaaac	cacttggttg	agaagccctt	gccagagtga	4140
agagggctga	gaagaaatgg	agggacaaga	gagagaagtt	ggagtgggaa	acaaacattg	4200
tgtacaaaga	agccaaagaa	tcagttgatg	ctttgtttgt	gaactcccaa	tatgataggc	4260
tccaagctga	caccaacata	gcaatgattc	atgctgcaga	caaaagggtt	cacagcattc	4320
gtgaagcata	ccttcctgaa	ctctcagtga	ttcctgggg	caatgctgca	atctttgaag	4380
agcttgaagg	acgcactctc	actgccttct	ccttgatga	tgcaaggaat	gtcatcaaga	4440
atggtgactt	caacaatggc	ctttcctgct	ggaatgtgaa	agggcacgtg	gatgttgaag	4500
agcagaacaa	tcaccgctct	gtccttgttg	tccctgagtg	ggaagctgaa	gtttcacaag	4560
aagttcgtgt	ctgccctgg	cgtggctaca	ttcttcgtgt	gactgcttac	aaagaaggct	4620
atggagaagg	ttgtgtcacc	atccacgaga	tagagaacaa	tactgatgaa	ttgaagttca	4680
gcaactgtgt	tgaggaagag	gtctacccaa	acaatactgt	cacttgcaat	gactacactg	4740
caactcaaga	agagtatgag	ggcacttaca	cttctcgcaa	ccgtggctat	gatggagcct	4800
atgagagcaa	ctcatctgtg	cctgctgact	atgcttcagc	ctatgaagag	aaggcataca	4860
ctgatggaag	gcgtgacaat	ccttggtgaa	gcaacagagg	ctatggggac	tacacacccc	4920
tcccagctgg	ctatgtgacc	aaagagttgg	agtactttcc	tgaaactgac	aaggtttgg	4980
ttgagatagg	agaaactgaa	ggcacattca	tagttgactc	tgtggagctt	ttgctcatgg	5040
aagagtgagt	agttagctta	atcacctaga	gctcggtcac	cagcataatt	tttattaatg	5100
tactaaatta	ctgttttgtt	aatgcaatt	ttgctttctc	gggattttta	tatcaaaatc	5160

tatttagaaa tacacaatat tttgttgacag gcttgctgga gaatcgatct gctatcataa	5220
aaattacaaa aaaatTTTTat ttgcctcaat tatttttagga ttggtattaa ggacgcttaa	5280
attatttgtc gggtcactac gcatcattgt gattgagaag atcagcgata cgaaatatct	5340
gtagtactat cgataattta tttgaaaatt cataagaaaa gcaaacgtta catgaattga	5400
tgaacaata caaagacaga taaagccacg cacatttagg atattggccg agattactga	5460
atattgagta agatcacgga atttctgaca ggagcatgtc ttcaattcag cccaaatggc	5520
agttgaaata ctcaaaccgc cccatatgca ggagcggatc attcattgtt tgtttggttg	5580
cctttgccaa catgggagtc caaggttgcg gccgcgcgcc gaaaacaact ttgtatacaa	5640
aagttgccgc ggtgactgac tgaactaaac ccagaaggta attatccaag atgtagcatc	5700
aagaatccaa tgtttacggg aaaaactatg gaagtattat gtaagctcag caagaagcag	5760
atcaatatgc ggcacatatg caacctatgt tcaaaaatga agaattgaca gatacaagat	5820
cctatactgc cagaatacga agaagaatac gtagaaattg aaaaagaaga accaggcgaa	5880
gaaaagaatc ttgaagacgt aagcactgac gacaacaatg aaaagaagaa gataaggtcg	5940
gtgattgtga aagagacata gaggacacat gtaaggtgga aaatgtaagg gcggaaagta	6000
accttatcac aaaggaatct tatccccac tacttatcct tttatatTTT tccgtgtcat	6060
ttttgccctt gagttttcct atataaggaa ccaagttcgg catttgtaga aacaagaaaa	6120
aatttggtgt aagctatTTT ctttgaagta ctgaggatac aacttcagag aaatttgtaa	6180
gtttgtagat ccaacaatgg acaacaatcc caacatcaac gagtgcattc cttacaactg	6240
cctgagcaac cctgaggttg aggtgctggg tggagaacgg attgagactg gttacacacc	6300
tatogacatc tcgttgtcac ttaccaatt ccttttgtca gagtctgtgc ccggtgctgg	6360
attcgtgctt ggacttgtcg atatcatttg gggaatcttt ggtccctctc aatgggacgc	6420
ctttcttgta cagatagagc agttaattaa ccaaagaata gaagaattcg ctaggaacca	6480
agccatctca aggttagaag gcctcagcaa cctttaccag atttacgcag aatcttttcg	6540
agagtgggaa gcagaccga ccaatcctgc cttaagagag gagatgcgca ttcaattcaa	6600
tgacatgaac agcgcgctga cgaccgcaat tccgctcttc gccgttcaga attaccaagt	6660
tcctctttta tccgtgtacg tgcaggctgc caacctgcac ttgtcgggtgc tccgcgatgt	6720
ctccgtgttc ggacaacggg ggggctttga tgccgcaact atcaatagtc gttataatga	6780
tctgactagg cttattggca actataccga ttatgctgtt cgctggtaca acacgggtct	6840
cgaacgtgtc tggggaccgg attctagaga ttgggtcagg tacaaccagt tcaggcgaga	6900
gttgacacta actgtcctag acattgtcgc tctctttccc aactacgact ctaggcgcta	6960
cccaatccgt actgtgtcac aattgaccgg ggaaatctac acaaaccag tcctcgagaa	7020
cttcgacggg agctttcgag gctcggctca gggcatagag agaagcatca ggtctccaca	7080

cctgatggac atattgaaca gtatcacgat ctacaccgat gcgcaccgcg gttattacta	7140
ctggtcaggg catcagatca tggcatcacc cgttgggttc tctggaccag aattcacttt	7200
cccactttac gggactatgg gcaatgcagc tccacaacaa cgtattgttg ctcaactcgg	7260
tcaggggcgtg tatagaacct tgtccagcac tctatatagg agacctttca acatcggcat	7320
caacaatcaa caattgtctg tgcttgacgg gacagaattt gcctatggaa cctcctcaaa	7380
tctgccatcc gctgtctaca gaaagagcgg aacagttgat agcttggatg agatccctcc	7440
acagaacaac aacgttccac ctaggcaagg gtttagccat cgccttagcc atgtgtccat	7500
gttccgttca ggcttttagta atagcagcgt tagtatcatc agagctccga tgttctcttg	7560
gatacatcgt agtgctgagt ttaacaacat aattgcatcc gatagcatta ctgagatccc	7620
agctgtcaag gggaaactttc tctttaatgg ttctgtcatt tcaggaccag gattcactgg	7680
aggcgacttg gttaggctga attcttccgg caacaacatc cagaatagag ggtatattga	7740
agtgccatt cacttcccat cgacatctac cagatatcgt gttcgtgtaa ggtatgcctc	7800
tgttaccctt attcacctca acgtcaattg gggtaattcc tccatctttt ccaatacagt	7860
accagcgaca gctacatcct tggataatct ccaatctagc gatttcgggt acttcgaaag	7920
tgccaatgcc ttcacctctt ccctaggtaa catagtaggt gttagaaatt tctccggaac	7980
cgccggagtg ataatcgacc gcttcgaatt cattcccggt actgcaacgc tcgaggcaga	8040
gtctgacttg gaaagagcac agaaggcggg gaatgctctg ttcacttcgt ccaatcagat	8100
tgggctcaag acagatgtga ctgactatca catcgatcgc gtttccaacc ttgttgagtg	8160
cctctctgat gagttctgtt tggatgagaa gaaggagttg tccgagaagg tcaaacatgc	8220
taagcgactt agtgatgagc ggaacttgct tcaagatccc aactttcgcg ggatcaacag	8280
gcaactagat cgtggatgga ggggaagtac ggacatcacc attcaaggag gtgatgatgt	8340
gttcaaggag aactatgtta cgctcttggg tacctttgat gagtgcctatc caacatacct	8400
gtaccagaag atagatgaat cgaaactcaa agcctacaca agataccagt tgagaggtta	8460
catcgaggac agtcaagacc ttgagatcta cctcatcaga tacaacgcca aacatgagac	8520
agtcaatgtg cctgggacgg gttcactctg gccactttca gcccgaagtc ccatcggcaa	8580
gtgtgcccatt cactcacacc acttctcctt ggacatagac gttggctgta ccgacctgaa	8640
cgaagacctc ggtgtgtggg tgatcttcaa gatcaagact caagatggcc atgccaggct	8700
aggcaatctg gagtttctag aagagaaacc acttgttgga gaagccctcg ctagagtgaa	8760
gagggctgag aagaagtgga gggacaagag agagaagttg gaatgggaaa caaacattgt	8820
gtacaaagaa gccaaagaaa gcgttgacgc tctgtttgtg aactctcagt atgataggct	8880
ccaagctgat accaacadatg ctatgattca tgctgcagac aaacgcgttc atagcattcg	8940
ggaagcttac cttcctgaac ttagcgtgat tccgggtgtc aatgctgcta tctttgaaga	9000

gttagaaggg	cgcatcttca	ctgcattctc	cttgatgat	gcgaggaatg	tcacaaagaa	9060
tggtgacttc	aacaatggcc	tatcctgctg	gaatgtgaaa	gggcacgtag	atgtagaaga	9120
acagaacaat	caccgctctg	tccttggtgt	tcctgagtgg	gaagcagaag	tttcacaaga	9180
agttcgtgtc	tgtcctggtc	gtggctacat	tcttcgtgtt	accgcgtaca	aagaaggata	9240
cggagaaggt	tgcgtcacca	tacacgagat	tgagaacaac	accgacgagc	tgaagttagc	9300
caactgctgc	gaggaggaag	tctacccaaa	caacaccgta	acttgcaatg	actacactgc	9360
gactcaagag	gagtatgagg	gtacttacac	ttctcgcaat	cgaggatagc	atggagccta	9420
tgagagcaac	tcttctgtac	ccgctgacta	tgcatacagc	tatgaggaga	aggcttacac	9480
cgatggacgt	agggacaatc	cttgcgaaatc	taacagaggc	tatggggact	acacaccgtt	9540
accagccggc	tatgtcacca	aagagttaga	gtactttcca	gaaaccgaca	aggtttgat	9600
tgagattgga	gaaacggaag	gaacattcat	tgttgatagc	gtggagttac	ttctgatgga	9660
ggaatgagta	gttagcttaa	tcacctagag	ctcggttacc	tatcaaaatc	tatttagaaa	9720
tacacaatat	tttggtgcag	gcttgctgga	gaatcgatct	gctatcataa	aaattacaaa	9780
aaaattttat	ttgcctcaat	tatttttagga	ttgggtattaa	ggacgcttaa	attatattgtc	9840
gggtcactac	gcatcattgt	gattgagaag	atcagcgata	cgaaatattc	gtagtactat	9900
cgataattta	tttgaaaatt	cataagaaaa	gcaaacgtta	catgaattga	tgaaacaata	9960
caaagacaga	taaagccacg	cacatttagg	atattggccg	agattactga	atattgagta	10020
agatcacgga	atttctgaca	ggagcatgtc	ttcaattcag	cccaaattggc	agttgaaata	10080
ctcaaaccgc	cccatatgca	ggagcggatc	attcattgtt	tgtttggttg	cctttgccaa	10140
catgggagtc	caaggttgcg	gccgcgcgcc	gaccagctt	tcttgtaaaa	agtggttgcg	10200
gccgcttaat	taaattttaa	tgcccgggcg	tttaaaccgc	gccgcttaat	taaggccggc	10260
ctgcagcaaa	cccagaaggt	aattatccaa	gatgtagcat	caagaatcca	atgtttacgg	10320
gaaaaactat	ggaagtatta	tgtaagctca	gcaagaagca	gatcaatatg	cggcacatat	10380
gcaacctatg	ttcaaaaatg	aagaatgtac	agatacaaga	tcctatactg	ccagaatacgc	10440
aagaagaata	cgtagaaatt	gaaaaagaag	aaccaggcga	agaaaagaat	cttgaagacg	10500
taagcactga	cgacaacaat	gaaaagaaga	agataaggct	ggtgattgtg	aaagagacat	10560
agaggacaca	tgtaagggtg	aaaatgtaag	ggcggaaagt	aaccttatca	caaaggaatc	10620
ttatccccc	ctacttatcc	ttttatat	ttccgtgtca	tttttgccct	tgagttttcc	10680
tatataagga	accaagtctg	gcatttgtga	aaacaagaaa	aaatttggtg	taagctattt	10740
tctttgaagt	actgaggata	caacttcaga	gaaatttgta	agtttgtaga	tctccatgtc	10800
tccggagagg	agaccagttg	agattaggcc	agctacagca	gctgatatgg	ccgcggtttg	10860
tgatatcggt	aaccattaca	ttgagacgtc	tacagtgaac	tttaggacag	agccacaaac	10920

```

accacaagag tggattgatg atctagagag gttgcaagat agataccctt ggttggttgc 10980
tgagggttgag ggtggttggt ctggtattgc ttacgctggg ccctggaagg ctaggaacgc 11040
ttacgattgg acagttgaga gtactgttta cgtgtcacat aggcacaaa ggttgggcct 11100
aggatccaca ttgtacacac atttgcttaa gtctatggag gcgcaagggt ttaagtctgt 11160
ggttgctggt ataggccttc caaacgatcc atctgttagg ttgcatgagg ctttgggata 11220
cacagcccg ggtacattgc ggcagctgg atacaagcat ggtggatggc atgatgttg 11280
tttttgcaa agggattttg agttgccagc tcctccaagg ccagttaggc cagttacca 11340
gatctgaggt accctgagct tgagcttatg agcttatgag cttagagctc ggatccacta 11400
gtaacggccg ccagtgtgct ggaattcgcc cttgactaga taggcgcca gatcggcggc 11460
aatagcttct tagcgccatc ccgggttgat cctatctgtg ttgaaatagt tgcggtgggc 11520
aaggctctct ttcagaaaga caggcggcca aaggaacca aggtgaggtg ggctatggct 11580
ctcagttcct tgtggaagcg cttggtctaa ggtgcagagg tgttagcggg atgaagcaaa 11640
agtgtccgat tgtaacaaga tatgttgatc ctacgtaagg atattaaagt atgtattcat 11700
cactaatata atcagtgtat tccaatatgt actacgattt ccaatgtctt tattgtcgcc 11760
gtatgtaatc ggcgtcacia aataatcccc ggtgactttc ttttaatcca ggatgaaata 11820
atatgttatt ataatttttg cgatttggtc cgttatagga attgaagtgt gcttgcggtc 11880
gccaccactc ccatttcata attttacatg tatttgaaaa ataaaaattt atgggtattca 11940
atttaaacac gtatacttgt aaagaatgat atcttgaaag aaatatagtt taaatattta 12000
ttgataaaat aacaagtcag gtattatagt ccaagcaaaa acataaattt attgatgcaa 12060
gtttaaattc agaaatattt caataactga ttatatcagc tggtagattg ccgtagatga 12120
aagactgagt gcgatattat ggtgtaatac atagcggccg ggtttctagt caccgggttag 12180
gatccgttta aactcgaggc tagcgcatgc acatagacac acacatcatc tcattgatgc 12240
ttggtaataa ttgtcattag attgttttta tgcatagatg cactcgaaat cagccaattt 12300
tagacaagta tcaaacggat gtgacttcag tacattaaaa acgtccgcaa tgtgttatta 12360
agttgtctaa gcgtcaattt g 12381

```

```

<210> 4
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Праймер 81419_FW3

```

```

<400> 4
tttctctat ccgtcaaata aatctgctcc

```

30

<210> 5
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Праймер 81419_RV1

 <400> 5
 ggggtgatttg gtgccaaaag ttatggt 27

 <210> 6
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність <220>

 <220>
 <223> Праймер 81419_RV1

 <400> 6
 tggagggtca tatcgcaaaa gact 24

 <210> 7
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Праймер 81419_RV3

 <400> 7
 gttctgcgtc gtggagggtc atat 24

 <210> 8
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Праймер 5'IREnd-01

 <400> 8
 cgagctttct aatttcaaac tattcgggc 29

 <210> 9
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Праймер 5'IREnd-02

 <400> 9
 tcttagatca tcagttcata caaacctcca 30

 <210> 10
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AtUbi10RV1

<400> 10
 cggtcctaga tcatcagttc atacaaacc 29

<210> 11
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер AtUbi10RV2

<400> 11
 cactcgtggt cagtccaatg aaccaataa 28

<210> 12
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер 3'PATEnd05

<400> 12
 gctcctccaa ggccagttag 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Праймер 3'PATEnd06

<400> 13
 ccagttaggc cagttaccca 20

<210> 14
 <211> 15294
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Последовательность трансформанта сои 9582.814.19.1

<400> 14
 ttaacaatga ccaagattta tgctatatag aagacttgga gggcttaagg ctatgatata 60
 ttatggatga tatggttctg atttgtgtag ttctgaagga tcaaatcaac catttggtgg 120
 tacaatggga agaaaaaatg ttttcatcat tccactctat tgaaaaagat ccaacaattg 180
 taacaccccg acgaatcaca ccggaaagag aagaatccaa agattgtgta ggtatgagac 240
 tgtatagttg atgaaaactt aaaaaaatta attggtacta cttataccaa caagatgcat 300
 atatttttcg atagcctatc acataagaac ttcatagtta agggtgctta acttggagta 360

gttatgaaat gagtgacctt ttaaaataat tattgtctta gggtattgta tgaaaataaa	420
aaataataat aaatatacat aaaaaataat aattttataa aattaacctt atattatcat	480
taattttattt ttagattttg ttattcatta ttaatatatg aggtataaat gaaaaatata	540
attaatgtca cattaaaaaa ttaaaatgat aattattttg aaacaaatta tttattttta	600
tacgacaatt ataatagaaa tttgagagta aaaaaaatt gaaaattcat aaaatatatg	660
aatatatcca tttctcctat ccgtcaaata aatctgctcc ataatttatc taagcattgg	720
tcttgtagtt cagagtaata aaatttttagc aattattagt tagtacagat acatttaaag	780
aaataatata ttttagcaac tagaagttta taaaaagttt taaattataa agacttatat	840
ataaatttag taaaactaga tggatgtccc aagtaatttt tatataacta ttctcgtaca	900
acattaatga aaatcttggt tctattattt atatgtatat tattatttta ttttggaca	960
atatgggatt aaaaactctt ataaattaaa tcttagaata agttttccta acatgttttt	1020
tttatggatg ttttcctaac atgtttgggt atcttagttt tgctttaatt ttgtcggatt	1080
atttttggac tttattaggt aattttgata aaacttttag ttgatgttag tagtttactc	1140
ttacataatg atttgatatt gaatgtgtat aattggaagg caataaatga agatcaagcg	1200
tacaagagtt cgccaatcaa gaggatttga agagagtaaa atattatgcg aagtcccatg	1260
tgaagaaaat ccaaccattg gaataaaaaa taaagttttt tctttggaat tgctaattgct	1320
acagcactta ttggtacttg tcctaataat gaaactctag ctatatattag cacttgatat	1380
tcatgaatca aacttctcta tgaaataacc gcggtgcgca tcggtgcctg ttgatcccgc	1440
gcaagttggg atcttgaagc aagttccgct catcactaag tcgcttagca tgtttgacct	1500
tctcggacaa ctcttcttc tctttaattg atcaacagtc agcatcatca caccaaaagt	1560
taggcccga tagtttgaaa ttagaaagct cgcaattgag gtctacaggc caaattcgct	1620
cttagccgta caatattact caccggatcc taaccggtgt gatcatgggc cgcgattaaa	1680
aatctcaatt atatttggtc taatttagtt tggatttgag taaaacaaat tcggcgccat	1740
gcccgggcaa gcggccgcac aagtttgtac aaaaaagcag gctccgcggt gactgactga	1800
aaagcttgtc gacctgcagg tcaacggatc aggatattct tgtttaagat gttgaactct	1860
atggaggttt gtatgaactg atgatctagg accggataag ttcccttctt catagcgaac	1920
ttattcaaag aatgttttgt gtatcattct tgttacattg ttattaatga aaaaatatta	1980
ttggtcattg gactgaacac gagtggttaa tatggaccag gccccaaata agatccattg	2040
atatatgaat taaataacaa gaataaatcg agtcacacaa ccacttgcct tttttaacga	2100
gacttggtca ccaacttgat acaaaagtca ttatcctatg caaatcaata atcatacaaa	2160
aatatccaat aacactaaaa aattaaaaga aatggataat ttcacaatat gttatacgat	2220
aaagaagtta cttttccaag aaattcactg attttataag cccacttgca ttagataaat	2280

ggcaaaaaaa aacaaaaaagg aaaagaaata aagcacgaag aattctagaa aatacgaat	2340
acgcttcaat gcagtgggac ccacggttca attattgcc aatttcagct ccaccgtata	2400
tttaaaaaat aaaacgataa tgctaaaaaa atataaatcg taacgatcgt taaatctcaa	2460
cggctggatc ttatgacgac cgtagaaat tgtggttgtc gacgagtcag taataaacgg	2520
cgtcaaagtg gttgcagccg gcacacacga gtcgtgttta tcaactcaaa gcacaaatac	2580
ttttcctcaa cctaaaaata aggcaattag caaaaaaca ctttgcgtgt aaacaacgct	2640
caatacacgt gtcattttat tattagctat tgcttcaccg ccttagcttt ctcgtagcct	2700
agtcgtcctc gtcttttctt cttcttcttc tataaaacaa tacccaaagc ttcttcttca	2760
caattcagat ttcaatttct caaaatctta aaaactttct ctcaattctc tctaccgtga	2820
tcaaggtaaa tttctgtgtt ccttattctc tcaaaatctt cgattttgtt ttcgttcgat	2880
cccaatttcg tatatgttct ttggtttaga ttctgttaat cttagatcga agacgatttt	2940
ctgggtttga tcgtagata tcatcttaat tctcgattag ggtttcataa atatcatccg	3000
atttgttcaa ataatttgag ttttgtcgaa taattactct tcgatttggtg atttctatct	3060
agatctggtg ttagtttcta gtttgtgcga tcgaatttgt cgattaatct gagtttttct	3120
gattaacaga gatctccatg gagaacaata tccagaacca gtgtgtccca tacaattgcc	3180
tcaacaatcc tgaagttgag atcctcaacg aagagaggag cactggacgc cttccccttg	3240
acatctccct ctccctcaca aggttccttt tgtctgagtt tgttcctggt gtgggtgtgg	3300
cctttggcct ctttgacctc atctggggct tcatcacccc atctgattgg agcctcttcc	3360
ttctccagat tgaacaattg attgagcaga ggattgagac ccttgaaagg aacagagcca	3420
tcaccacact tcgtggcctt gctgacagct atgaaatcta cattgaagca ctccgtgagt	3480
gggaagccaa tcccaacaat gctcaactcc gtgaagatgt gaggattcgc tttgccaaaca	3540
cagatgacgc tttgatcaca gccatcaaca atttcacct caccagcttt gagatccctt	3600
tgctctcagt ctatgttcaa gctgcaaacc tccacttgag cttgcttagg gatgctgtgt	3660
ccttcggaca aggttgggga cttgacatag ccactgtcaa caatcactac aacagactca	3720
tcaacttgat tcatcgctac accaaacatt gcttgacac ctacaatcaa ggattggaga	3780
acctcagagg caccaacact cgccaatggg caagggttcaa ccagttttaga agggatctca	3840
cactcactgt gcttgacata gttgctctct tcccacta tgatgttcgc acctacccaa	3900
ttcaaaccag ctcccaactt acaagggaat tctacacct ctcagtcatt gaggacagcc	3960
cagtttctgc caacatacc aatgggttca accgtgctga gtttgggtgc agaccacccc	4020
atctcatgga cttcatgaac tccttgtttg tgactgccga gactgttagg tcccaaactg	4080
tgtggggagg ccaccttggt agctcccgca acaccgctgg caaccgcac aacttcccat	4140
cctatgggggt tttcaatcct ggtggagcca tctggattgc agatgaggac ccaaggcctt	4200

tctacagaac	cttgtcagat	cctgtctttg	tcagaggagg	ctttggcaat	ccacactatg	4260
ttcttggttt	gaggggagtg	gcttttcagc	agactggcac	caatcacacc	cgcacattca	4320
gaaacagcgg	caccattgac	agccttgatg	agatcccacc	tcaagacaac	agcggagcac	4380
cctggaacga	ctactcccat	gtgctcaatc	atgtcacctt	tgtgcgctgg	cctggtgaga	4440
tcagcggttc	agattcttgg	agagcaccaa	tgttctcatg	gacccatcgc	tctgccacac	4500
ccacaaacac	cattgatcca	gagagaatca	cccagattcc	cttggtgaag	gcacacacac	4560
ttcagtctgg	aaccacagtt	gtcagagggc	ctgggttcac	tgggtggagac	attctcagac	4620
gcacctctgg	agggccattt	gcttacacca	ttgtcaacat	caatgggcaa	cttccccagc	4680
gttaccgtgc	cagaatccgc	tatgcttcca	ccactaactt	gagaatctat	gtcacagttg	4740
ctggtgaaag	gatctttgct	ggtcagttca	acaagacaat	ggacactggg	gatccattga	4800
cattccagtc	attctcctat	gccaccatca	acactgcatt	cacctttcca	atgagccagt	4860
ccagcttcac	agtgggtgca	gataccttca	gctccggcaa	tgaggtgtac	attgaccgct	4920
ttgagttgat	tccagtgact	gccacacttg	aggctgagtc	tgacttggag	cgtgctcaga	4980
aggccgtgaa	tgtctcttcc	acctcttcaa	atcagattgg	gctcaagaca	gatgtgactg	5040
actaccatat	agaccgtggt	tccaatcttg	ttgagtgcct	ctctgatgag	ttctgcttgg	5100
atgagaagaa	agagttgtca	gagaagggtca	agcacgccaa	gaggctctct	gatgagagga	5160
acttgcttca	agatcccaac	ttcagagggg	tcaaccgtca	attggatcgt	ggatggaggg	5220
gatcaactga	cataaccatt	caaggaggtg	acgatgtggt	caaggagaac	tatgtcacac	5280
tcttggggac	ctttgatgag	tgctacccaa	cataccttta	ccagaagata	gacgaaagca	5340
agctcaaggc	ctacacaaga	taccagttga	gaggttacat	tgaggactct	caagaccttg	5400
aaatctacct	catcagatac	aacgccaaac	atgagacagt	caatgtgcct	gggactgggt	5460
cactctggcc	actttcagcc	ccaagcccca	ttggcaagtg	tgcccatcac	tcacatcact	5520
tctccttgga	catagatggt	ggctgcactg	acttgaatga	ggaccttggg	gtgtgggtga	5580
tcttcaagat	caagacccaa	gatggccatg	caagggtggg	caatcttgag	tttcttgaag	5640
agaaaccact	tgttgagaga	gcccttgcca	gagtgaagag	ggctgagaag	aaatggaggg	5700
acaagagaga	gaagttggag	tgggaaacaa	acattgtgta	caaagaagcc	aaagaatcag	5760
ttgatgcttt	gtttgtgaac	tcccaatatg	ataggctcca	agctgacacc	aacatagcaa	5820
tgattcatgc	tcagacaaa	agggttcaca	gcattcgtga	agcatacctt	cctgaactct	5880
cagtgattcc	tggggtcaat	gctgcaatct	ttgaagagct	tgaaggacgc	atcttcaactg	5940
ccttctcctt	gtatgatgca	aggaatgtca	tcaagaatgg	tgacttcaac	aatggccttt	6000
cctgctggaa	tgtgaaaggg	cacgtggatg	ttgaagagca	gaacaatcac	cgtctgttcc	6060
ttgttgtccc	tgagtgggaa	gctgaagttt	cacaagaagt	tcgtgtctgc	cctgggtcgtg	6120

gctacattct tcgtgtgact gcttacaaag aaggctatgg agaaggttgt gtcaccatcc	6180
acgagataga gaacaatact gatgaattga agttcagcaa ctgtgttgag gaagaggtct	6240
acccaaacaa tactgtcact tgcaatgact aacttgcaac tcaagaagag tatgagggca	6300
cttacacttc tcgcaaccgt ggctatgatg gagcctatga gagcaactca tctgtgcctg	6360
ctgactatgc ttcagcctat gaagagaagg catacactga tgggaaggcgt gacaatcctt	6420
gtgaaagcaa cagaggctat ggggactaca cccccctccc agctggctat gtgaccaaag	6480
agttggagta ctttcctgaa actgacaagg tttggattga gataggagaa actgaaggca	6540
cattcatagt tgactctgtg gagcttttgc tcatggaaga gtgagtagtt agcttaatca	6600
cctagagctc ggtcaccagc ataattttta ttaatgtact aaattactgt tttgttaaat	6660
gcaattttgc tttctcggga ttttaatatc aaaatctatt tagaaataca caatattttg	6720
ttgcaggctt gctggagaat cgatctgcta tcataaaaat tacaaaaaaa ttttatttgc	6780
ctcaattatt ttaggattgg tattaaggac gcttaaatta tttgtcgggt cactacgcat	6840
cattgtgatt gagaagatca gcgatacgaa atattcgtag tactatcgat aatttatttg	6900
aaaattcata agaaaagcaa acgttacatg aattgatgaa acaatacaaa gacagataaa	6960
gccacgcaca tttaggatat tggccgagat tactgaatat tgagtaagat cacggaattt	7020
ctgacaggag catgtcttca attcagccca aatggcagtt gaaatactca aaccgcccc	7080
tatgcaggag cggatcattc attgtttgtt tggttgcctt tgccaacatg ggagtccaag	7140
gttgcgggccg cgcgccgaaa acaactttgt atacaaaagt tgccgcggtg actgactgaa	7200
ctaaaccag aaggttaatta tccaagatgt agcatcaaga atccaatgtt tacgggaaaa	7260
actatggaag tattatgtaa gctcagcaag aagcagatca atatgcggca catatgcaac	7320
ctatgttcaa aaatgaagaa tgtacagata caagatccta tactgccaga atacgaagaa	7380
gaatacgtag aaattgaaaa agaagaacca ggcaagaaa agaactttga agacgtaagc	7440
actgacgaca acaatgaaaa gaagaagata aggtcgggtga ttgtgaaaga gacatagagg	7500
acacatgtaa ggtggaaaat gtaagggcgg aaagtaacct tatcaciaag gaatcttctc	7560
ccccactact tatcctttta tttttttccg tgtcattttt gcccttgagt tttcctatat	7620
aaggaaccaa gttcggcatt tgtgaaaaca agaaaaaatt tgggtgtaagc tattttcttt	7680
gaagtactga ggatacaact tcagagaaat ttgtaagttt gtagatccaa caatggacaa	7740
caatcccaac atcaacgagt gcattcctta caactgcctg agcaaccctg aggttgaggt	7800
gctgggtgga gaacggattg agactggtta cacacctatc gacatctcgt tgtcacttac	7860
ccaattcctt ttgtcagagt tcgtgcccggtg tgctggattc gtgcttggaac ttgtcgatat	7920
catttgggga atctttgggc cctctcaatg ggacgccttt cttgtacaga tagagcagtt	7980
aattaaccaa agaatagaag aattcgctag gaaccaagcc atctcaaggt tagaaggcct	8040

cagcaacctt taccagattt acgcagaatc ttttcgagag tgggaagcag acccgaccaa	8100
tcttgcccta agagaggaga tgcgcattca attcaatgac atgaacagcg cgctgacgac	8160
cgcaattccg ctcttcgccg ttcagaatta ccaagttcct cttttatccg tgtacgtgca	8220
ggctgccaac ctgcacttgt cgggtgctccg cgatgtctcc gtgttcggac aacggtgggg	8280
ctttgatgcc gcaactatca atagtcgtta taatgatctg actaggctta ttggcaacta	8340
taccgattat gctgttcgct ggtacaacac ggggtctcgaa cgtgtctggg gaccggattc	8400
tagagattgg gtcaggtaca accagttcag gcgagagttg aactaactg tcttagacat	8460
tgtcgtcttc tttcccaact acgactctag gcgctacca atccgtactg tgtcacaatt	8520
gacccgggaa atctacacaa acccagtcct cgagaacttc gacggtagct ttcgaggctc	8580
ggctcagggc atagagagaa gcatcaggtc tccacacctg atggacatat tgaacagtat	8640
cacgatctac accgatgcgc accgcggtta ttactactgg tcagggcata agatcatggc	8700
atcacccgtt gggttctctg gaccagaatt cactttccca ctttacggga ctatgggcaa	8760
tgcagctcca caacaacgta ttgttgctca actcggtcag ggcgtgtata gaaccttgct	8820
cagcactcta tataggagac ctttcaacat cggcatcaac aatcaacaat tgtctgtgct	8880
tgacgggaca gaatttgcct atggaacctc ctcaaactcg ccatccgctg tctacagaaa	8940
gagcggaaca gttgatagct tggatgagat cctccacag aacaacaacg ttccacctag	9000
gcaaggggtt agccatcgcc ttagccatgt gtccatgttc cgttcaggct ttagtaatag	9060
cagcgttagt atcatcagag ctccgatgtt ctcttgata catcgtagtg ctgagtttaa	9120
caacataatt gcatccgata gcattactca gatcccagct gtcaagggga actttctctt	9180
taatggttct gtcatttcag gaccaggatt cactggaggc gacttgggta ggctgaattc	9240
ttccggcaac aacatccaga atagagggta tattgaagtg cccattcaact tcccatcgac	9300
atctaccaga tatcgtgttc gtgtaaggta tgctctgtt acccctattc acctcaacgt	9360
caattggggg aattcctcca tcttttccaa tacagtacca gcgacagcta catccttgga	9420
taatctccaa tctagegatt tcggttactt cgaaagtgcc aatgccttca cctcttcctt	9480
aggtaacata gtaggtgtta gaaatttctc cggaaccgcc ggagtgataa tcgaccgctt	9540
cgaattcatt cccgttactg caacgctcga ggcagagtct gacttggaaa gagcacagaa	9600
ggcgggtgaat gctctgttca ctctgtccaa tcagattggg ctcaagacag atgtgactga	9660
ctatcacatc gatcgcggtt ccaaccttgt tgagtgcctc tctgatgagt tctgtttgga	9720
tgagaagaag gagttgtccg agaagggtcaa acatgctaag cgacttagtg atgagcggaa	9780
cttgcttcaa gatcccaact ttcgcgggat caacaggcaa ctagatcgtg gatggagggg	9840
aagtacggac atcaccattc aaggagggtga tgatgtgttc aaggagaact atgttacgct	9900
cttgggtacc tttgatgagt gctatccaac atacctgtac cagaagatag atgaatcgaa	9960

actcaaagcc tacacaagat accagttgag aggttacatc gaggacagtc aagaccttga	10020
gatctacctc atcagatata acgccaaaca tgagacagtc aatgtgcctg ggacgggttc	10080
actctggcca ctttcagccc caagtcccat cggcaagtgt gcccatcact cacaccactt	10140
ctccttggaac atagacgttg gctgtaccga cctgaacgaa gacctcggtg tgtgggtgat	10200
cttcaagatc aagactcaag atggccatgc caggctagtc aatctggagt ttctagaaga	10260
gaaaccactt gttggagaag ccctcgctag agtgaagagg gctgagaaga agtggaggga	10320
caagagagag aagttggaat gggaaacaaa cattgtgtac aaagaagcca aagaaagcgt	10380
tgacgctctg tttgtgaact ctcatgtatg taggctccaa gctgatacca acatagctat	10440
gattcatgct gcagacaaac gcgttcatac cattcgaggaa gcttaccttc ctgaacttag	10500
cgtgattccg ggtgtcaatg ctgctatctt tgaagagtta gaaggcgca tcttactgc	10560
attctccttg tatgatgcca ggaatgtcat caagaatggg gacttcaaca atggcctatc	10620
ctgctggaat gtgaaagggc acgtagatgt agaagaacag aacaatcacc gctctgtcct	10680
tgttggtcct gagtgggaag cagaagtctt acaagaagtt cgtgtctgtc ctggctgtgg	10740
ctacattctt cgtgttaccg cgtacaaaga aggatacggg gaagggtgag tcaccataca	10800
cgagattgag aacaacaccg acgagctgaa gttcagcaac tgcgtcgagg aggaagtcta	10860
cccaaacaac accgtaactt gcaatgacta cactgcgact caagaggagt atgagggtac	10920
ttacacttct cgcaatcgag gatacgatgg agcctatgag agcaactctt ctgtaccgcg	10980
tgactatgca tcagcctatg aggagaaggc ttacaccgat ggacgtaggg acaatccttg	11040
cgaatctaac agaggctatg gggactacac accgttacca gccggctatg tcaccaaaga	11100
gtagagtagc tttccagaaa ccgacaaggt ttggattgag attggagaaa cgggaaggaa	11160
attcattggt gatagcgtgg agttacttct gatggaggaa tgagtagtta gcttaatcac	11220
ctagagctcg gttacctatc aaaatctatt tagaaataca caatattttg ttgcaggctt	11280
gctggagaat cgatctgcta tcataaaaat tacaaaaaaa ttttatttgc ctcaattatt	11340
ttaggattgg tattaaggac gcttaaatta tttgtcgggt cactacgcat cattgtgatt	11400
gagaagatca gcgatacgaa atattcgtag tactatcgat aattttattg aaaattcata	11460
agaaaagcaa acgttacatg aattgatgaa acaatacaaa gacagataaa gccacgcaca	11520
tttaggatat tggccgagat tactgaatat tgagtaagat cacggaattt ctgacaggag	11580
catgtcttca attcagccca aatggcagtt gaaatactca aaccgccccca tatgcaggag	11640
cggatcattc attgtttggt tgggtgcctt tgccaacatg ggagtccaag gttgcggccg	11700
cgcgcgcacc cagctttctt gtacaaagtg gttgcggccg cttaattaaa tttaaatgcc	11760
cgggcgttta aacgcggccg cttaattaag gccggcctgc agcaaaccga gaaggttaatt	11820
atccaagatg tagcatcaag aatccaatgt ttacgggaaa aactatggaa gtattatgta	11880

agctcagcaa gaagcagatc aatatgcggc acatatgcaa cctatgttca aaaatgaaga	11940
atgtacagat acaagatcct atactgccag aatacgaaga agaatacgtg gaaattgaaa	12000
aagaagaacc aggcgaagaa aagaatcttg aagacgtaag cactgacgac aacaatgaaa	12060
agaagaagat aaggtcggtg attgtgaaag agacatagag gacacatgta aggtggaaaa	12120
tgtaaagggcg gaaagtaacc ttatcacaaa ggaatcttat cccccactac ttatectttt	12180
atattttttcc gtgtcatttt tgcccttgag ttttcctata taaggaacca agttcggcat	12240
ttgtgaaaac aagaaaaaat ttggtgtaag ctattttctt tgaagtactg aggatacaac	12300
ttcagagaaa tttgtaagtt tgtagatctc catgtctccg gagaggagac cagttgagat	12360
taggccagct acagcagctg atatggccgc ggtttgtgat atcgttaacc attacattga	12420
gacgtctaca gtgaacttta ggacagagcc acaaacacca caagagtgga ttgatgatct	12480
agagagggtg caagatagat acccttggtt gggtgctgag gttgagggtg ttgtggctgg	12540
tattgcttac gctgggccct ggaaggctag gaacgcttac gattggacag ttgagagtac	12600
tgtttacgtg tcacataggc atcaaagggt gggcctagga tccacattgt acacacattt	12660
gcttaagtct atggaggcgc aaggttttaa gtctgtggtt gctgttatag gccttccaaa	12720
cgatccatct gttagggtgc atgaggcttt gggatacaca gcccggggta cattgcgcgc	12780
agctggatac aagcatggtg gatggcatga tgttggtttt tggcaaaggg attttgagtt	12840
gccagctcct ccaaggccag ttaggccagt taccagatc tgaggtagcc tgagcttgag	12900
cttatgagct tatgagctta gagctcggat ccactagtaa cggccgccag tgtgctggaa	12960
ttcgcccttg actagatagg cgccagatc ggccgcaata gcttcttagc gccatcccgg	13020
gttgatccta tctgtgttga aatagttgcg gtgggcaagg ctctctttca gaaagacagg	13080
cggccaaagg aaccaagggt gaggtgggct atggctctca gttccttggtg gaagcgcttg	13140
gtctaagggtg cagaggtggt agcgggatga agcaaaagtg tccgattgta acaagatatg	13200
ttgatccctac gtaaggatat taaagtatgt attcatcact aatataatca gtgtattcca	13260
atatgtacta cgattttcaa tgtctttatt gtcgccgtat gtaatcggcg tcacaaaata	13320
atccccgggtg actttctttt aatccaggat gaaataatat gttattataa tttttgcgat	13380
ttggtccgtt ataggaattg aagtgtgctt gcggtcgcca ccactcccat ttcataattt	13440
tacatgtatt tgaaaaataa aaatttatgg tattcaattt aaacacgtat acttgtaaag	13500
aatgatatact tgaaagaaat atagtttaaa tattttattga taaaataaca agtcagggtat	13560
tatagtccaa gcaaaaacat aaatttattg atgcaagttt aaattcagaa atatttcaat	13620
aactgattat atcagctggg acattgccgt agatgaaaga ctgagtgcga tattatgggtg	13680
taatacatag cggccggggt tctagtcacc ggtagggtc cgtttaaact cgaggctagc	13740
gcatgcacat agacacacac atcatctcat tgatgcttgg taataattgt cattagattg	13800

```

tttttatgca tagatgcact cgaaatcagc caatttttaga caagtatcaa acggatgtga 13860
cttcagtaca ttaaaaacgt ccgcaatatg atattcatta attttatatt atctaaaaga 13920
gttaaaagag aaaaaagaaa tatgacaatt tttttctttc acatcttcta acctaaaagt 13980
atgactctat ggaggctaag tttagaaaaa gatacggatc taggggtgtgg aaacatcaat 14040
ggccaactcc ttttatattt caatcaattg ggttttgctt tatctttaca ttttctcctt 14100
ttattttcca cgtctattca aatctacttg ttagcgggtg attactcttt tttcttttat 14160
agatgccaat tatttctctc ctatgtatta aattagagta tattgtcttg aaagtgaatt 14220
agtattttag tttatagtct cttaaagaac gacacctttt attcttaact ctctttatca 14280
agttttaatt taaaattatt ttaaattaag tatgcataca tatcttaata tttttcttaa 14340
ttatttttta attccctaaa tttaatgttt tcatacaatg taagagatat acatattaat 14400
tatattttaa gataaaactt actttcctgc aataaaataa agaaaaggac agtcatacaa 14460
ttatataatt aatccagaat atttatagct tttaaacatt tattttctat caattaagta 14520
ataactttta ataaaattaa gagtactttt ttatactcca aagaatttat ttattttcaa 14580
caaaatcgtc tgactgtttc aattgatcat tatcagccta gcataaccta aatttcattt 14640
tcaaacataa cttttggcac caaatcacc ggcatgtcaa aaaagtcttt tgcgatatga 14700
ccctccacga cgcagaacca ctgttattca ttaccatcac ttttaactct aatttcccat 14760
acacttacc tttccatgac atcttcaaag cttttatfff gcttttcttg tttaagctgt 14820
tttaacctaa tttcatgcat ataaacaaag agtaaagcaa aggcaaatat ttgtacgtat 14880
agttttttag cagaaaagga aagtaaatta tagagataat gaagtttgct cttttaaatt 14940
cgtcgtgatg ttatccatca tatctaaatg cttattcctg tttttgtctt ttttctcttt 15000
taccggagtt tattttatat aattaattaa agttagtaga tctatattct ttttcataga 15060
taatccatct tctttggagg cacatcgatc attaatacata gagttttgag aagcattatc 15120
actaaagctt caattaatta tatccaataa acggtatattg tgtatgatgt tatgatagca 15180
aatagataat ctaatctata cgagccacaa aagggggcatg aactctatct cgaagaaatt 15240
ggagatgaag ggattgagat tggcaccttg tgctattatt gccactaat catt 15294

```

```

<210> 15
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Праймер 81419_3'F

```

```

<400> 15
tatgcataga tgcaactcgaa atca

```

24

```

<210> 16
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер 81419_3'R

<400> 16
gtttccacac cctagatccg tatc                                     24

<210> 17
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зонд 81419_3'P

<400> 17
ccgcaatatg atattca                                             17

<210> 18
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер GMS116 F

<400> 18
gtaatatggg ctcagaggaa tggc                                     24

<210> 19
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Праймер GMS116 R

<400> 19
atggagaaga acattggaat tgc                                     23

<210> 20
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Зонд GMS116

<400> 20
ccatggcccg gtaccatctg gtc                                     23

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

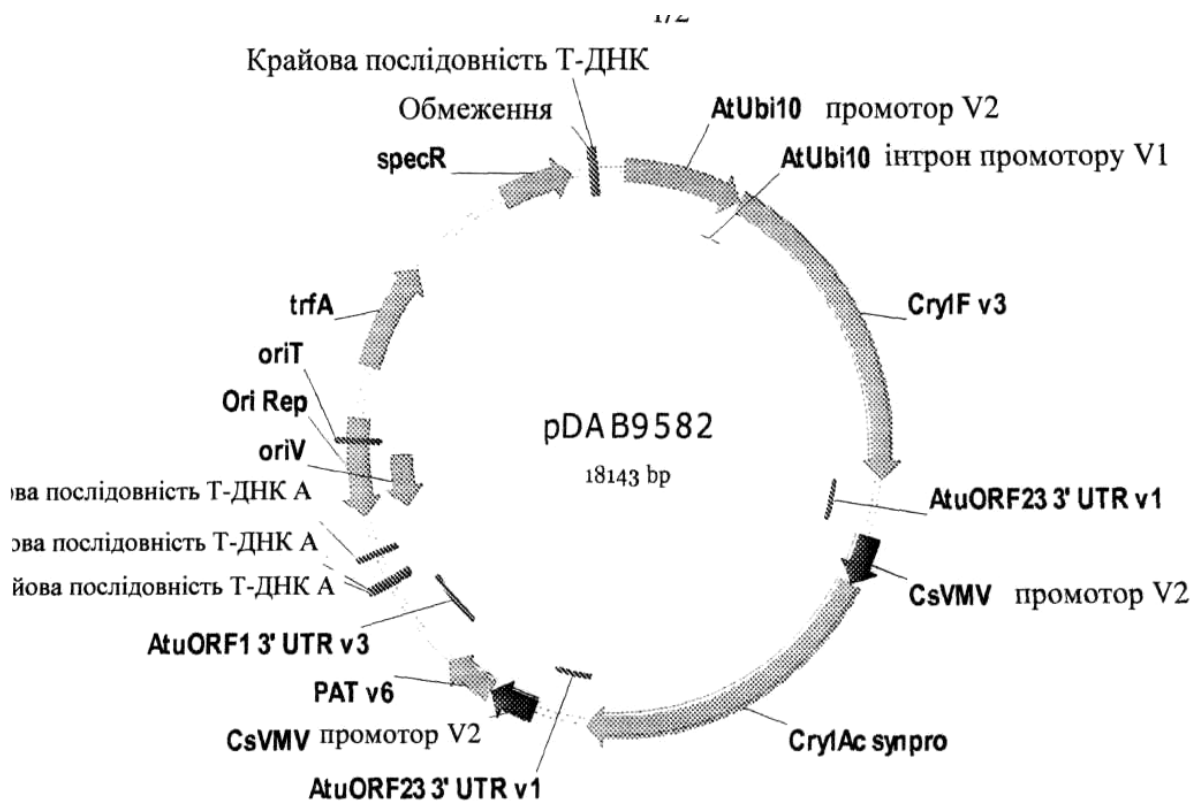
- 5 Спосіб виявлення нуклеотидної послідовності SEQ ID NO: 14 в зразку, що містить ДНК сої, який включає:
 - (а) приведення вказаного зразка в контакт з першим праймером довжиною щонайменше 10 п. о., який вибірково зв'язується з фланкуючою послідовністю в положенні пар основ 1-1400 SEQ

ID NO: 1 або її комплементом, і з другим праймером довжиною щонайменше 10 п. о., який вибірково зв'язується зі вставною послідовністю в положенні пар основ 1401-1836 SEQ ID NO: 1 або її комплементом; і

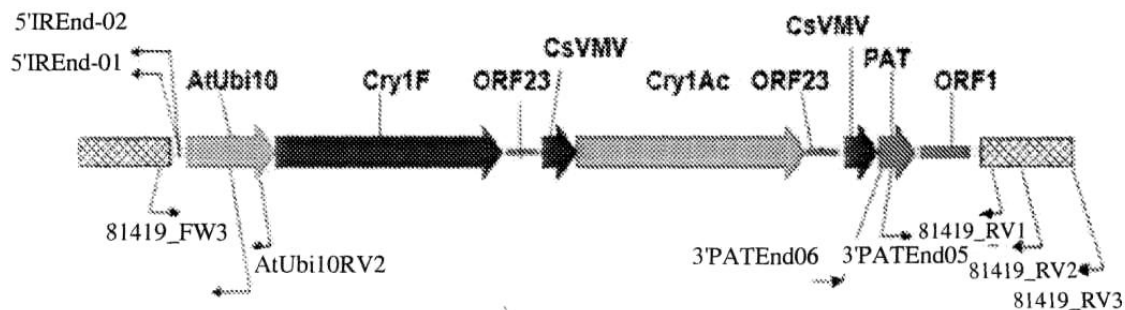
дослідження амплікона, утвореного між вказаними праймерами; або

- 5 (b) приведення вказаного зразка в контакт з першим праймером довжиною щонайменше 10 п. о., який вибірково зв'язується зі вставною послідовністю в положенні пар основ 1-152 SEQ ID NO: 2 або її комплементом, і з другим праймером довжиною щонайменше 10 п. о., який вибірково зв'язується з фланкуючою послідовністю в положенні пар основ 153-1550 SEQ ID NO: 2 або її комплементом; і

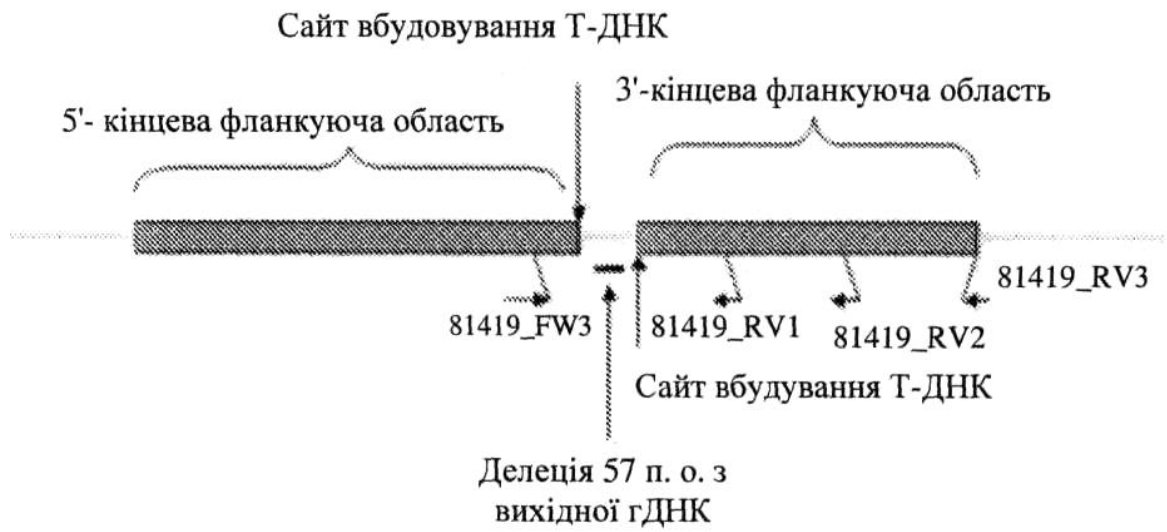
- 10 дослідження амплікона, утвореного між вказаними праймерами.



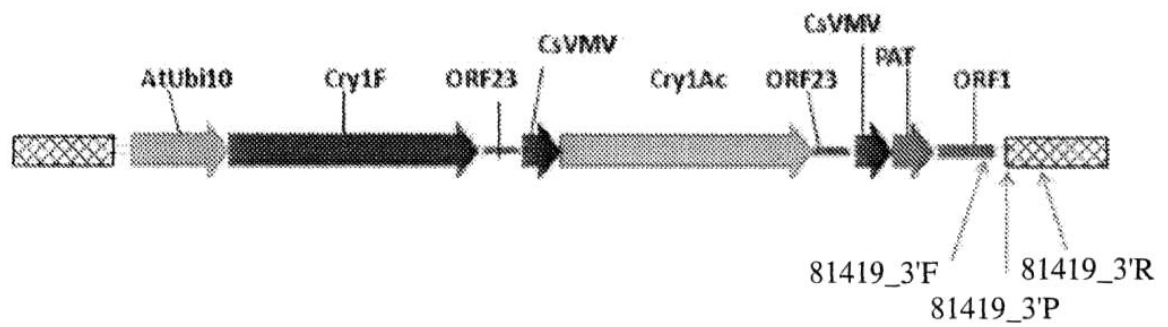
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601