

Изобретение относится к растениям, растительному материалу и семенам устойчивой к глифосату сахарной свеклы.

Как товарная культура, сахарная свекла (*Beta vulgaris*) выращивается многими странами. Ее валовой сбор составляет свыше 240 млн метрических тонн.

N-Фосфометилглицин, обычно называемый глифосат, - гербицид широкого спектра действия, широко применяемый вследствие его высокой эффективности, способности к биологическому разложению и малой токсичности для человека и животных. Глифосат ингибирует проводящую систему шикимовой кислоты, которая участвует в биосинтезе ароматических соединений, включая аминокислоты и витамины. В частности, глифосат ингибирует превращение фосфоенолпирувиноградной кислоты и 3-фосфошикимовой кислоты в 5-енолпирувил-3-фосфошикимовую кислоту путем подавления синтазы 5-енолпирувил-3-фосфошикимовой кислоты (EPSP-синтазы или EPSPS). Обработка обычных растений глифосатом приводит к утрате этими растениями способности продуцировать ароматические аминокислоты (например, фенилаланин и тирозин), необходимые для их роста и развития. EPSPS присутствует во всех растениях, бактериях и грибах. Она отсутствует у животных, которые не синтезируют ароматические аминокислоты. Так как у млекопитающих, птиц и водных животных форм проводящая система биосинтеза ароматических аминокислот отсутствует, то глифосат мало или вообще нетоксичен для этих организмов. EPSPS-Фермент естественно присутствует в пищевых продуктах животного и микробного происхождения.

Глифосат является активным ингредиентом таких гербицидов, как Раундап<sup>®</sup>, производимых компанией Монсанто, США. Обычно его состав определяется как водорастворимая соль, например аммонийная соль, алкиламинная соль, соль щелочного металла или триметилсульфониевая соль. Одним из наиболее распространенных составов является изопропиламинная соль глифосата. Именно этот состав применяется в гербициде Раундап<sup>®</sup>.

Известно, что устойчивые к глифосату растения можно получать путем встройки в геном растений механизма, способного продуцировать устойчивую к глифосату EPSPS-синтазу, например CP4-EPSPS на основе культур штамма CP4 *Agrobacterium*.

Устойчивое к глифосату растение сахарной свеклы можно получать методом трансформации на основе *Agrobacterium* путем интродуцирования в геном растения гена, например CP4-EPSPS, кодирующего устойчивую к глифосату EPSPS. Такое растение сахарной свеклы, экспрессирующее CP4-EPSPS, раскрыто в международной заявке, опубликованной под № WO99/23232. Однако растения сахарной свеклы, выращиваемые из клеток, трансформированных с помощью гена CP4-EPSPS так, как описано в этой заявке, сильно различаются по своим характеристикам, вследствие того, что этот ген встраивается в геном растения случайным образом. Встройку определенного трансгена в специфичное положение на хромосоме называют «явление рекомбинации». Термин «явление рекомбинации» также применяется для дифференцирования сортов растений, полученных методом геной инженерии. Желаемые явления рекомбинации очень редки. Большинство явлений рекомбинации отбраковываются, потому что встройка трансгена в ген растения, отвечающего за рост, приводит к его прерыванию и прекращению экспрессии, а встройка трансгена в часть хромосомы не обеспечивает экспрессию трансгена, или экспрессия очень слабая. В связи с этим требуется проводить скрининг большого количества явлений рекомбинации с целью идентифицировать явление рекомбинации, отличающееся достаточной экспрессией интродуцируемого гена. Эта процедура требует много времени и является весьма дорогостоящей.

Сущность настоящего изобретения состоит в получении растения сахарной свеклы, обладающего высокой степенью устойчивости к глифосату и лишённого недостатков касательно таких важных агротехнических характеристик, как рост, урожайность, качество, резистентность к патогенным микроорганизмам и т.п.

Устойчивое к глифосату растение сахарной свеклы согласно изобретению отличается тем, что содержит фрагмент ДНК размером от 630 до 700 п.о., предпочтительно 664 п.о., может быть амплифицирован из геномной ДНК растения сахарной свеклы, его частей или семян методом полимеразной цепной реакции с помощью первого праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, и второго праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, и/или фрагмент ДНК размером 3500-3900 п.о., предпочтительно 3706 п.о., может быть амплифицирован из геномной ДНК растения сахарной свеклы, его частей или семян методом полимеразной цепной реакции с помощью первого праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, и второго праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4, и/или фрагмент ДНК размером 270-300 п.о., предпочтительно 288 п.о., может быть амплифицирован из геномной ДНК растения сахарной свеклы, его частей или семян методом полимеразной цепной реакции с помощью первого праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, и второго праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, и/или фрагмент ДНК размером 710-790 п.о., предпочтительно 751 п.о., может быть амплифицирован из геномной ДНК растения сахарной свеклы, его частей или семян методом полимеразной цепной реакции с помощью первого праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9, и второго праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и/или фрагмент ДНК размером 990-1100 п.о., предпочтительно 1042 п.о., может быть амплифицирован из геномной ДНК расте-

ния сахарной свеклы, его частей или семян методом полимеразной цепной реакции с помощью первого праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, и второго праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - хорошо известный стандартный метод амплификации молекул нуклеиновой кислоты (см., например, патент США № 4683202).

Растение сахарной свеклы согласно изобретению (далее - явление рекомбинации Н7-1) проявляет высокую устойчивость к гербицидному глифосату. Кроме того, трансформация не влияет на особенности роста Н7-1 и его другие важные агротехнические характеристики. Н7-1 имеет высокую степень экспрессии гена CP4-EPSPS *Agrobacterium*, который стабильно инкорпорируется внутри генома растения и сообщает растению устойчивость к глифосату. Растение продуцировали методом трансформации на основе *Agrobacterium* с использованием бинарного вектора PV-BVGT08. Данный вектор содержал между лево- и правосторонними участками следующие последовательности: кодирующую область, включающую последовательность, которая кодирует хлоропластный транзит-пептид из *EPSPS Arabidopsis thaliana* (символ str2), связанную с последовательностью, которая кодирует CP4-EPSPS, под контролем промотора на основе вируса мозаики норичника (pFMV), и E9-3'-концевую последовательность терминации транскрипции из *Pisum sativum*.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения фрагменты ДНК размером 3706, 664, 288, 751 и 1042 п.о. проявляют по крайней мере 95%, предпочтительно по крайней мере 99%, более предпочтительно по крайней мере 99,9% сходство с нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 17, соответственно. Например, 95% сходство означает, что 95% нуклеотидов данной последовательности идентичны со сравниваемой последовательностью. В связи с этим последовательности можно выравнивать и проводить сравнение с помощью программы BLAST (доступна, например, на сайте: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/b12seq/b12.html>). Наиболее предпочтителен вариант осуществления изобретения, в котором фрагмент ДНК размером 3706 п.о. имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6, фрагмент ДНК размером 664 п.о. имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13, фрагмент ДНК размером 288 п.о. имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11, фрагмент ДНК размером 751 п.о. имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12 и/или фрагмент ДНК размером 1042 п.о. имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 17.

Объектом настоящего изобретения являются также семена вышеуказанного растения. Эти семена могут быть использованы для выращивания устойчивых к глифосату растений сахарной свеклы. Семена можно высевать, и культивируемые растения будут проявлять устойчивость к глифосату.

Объектом изобретения являются также клетка, ткань или часть устойчивого к глифосату растения сахарной свеклы.

Еще одним объектом настоящего изобретения является способ идентификации устойчивого к глифосату растения сахарной свеклы, отличающийся тем, что он включает этап(ы):

а) амплификации фрагмента ДНК размером от 630 до 700 п.о., предпочтительно размером 664 п.о., из геномной ДНК растения сахарной свеклы, его частей или семян методом полимеразной цепной реакции с помощью первого праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, и второго праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, и/или

б) амплификации фрагмента ДНК размером 3500-3900 п.о., предпочтительно 3706 п.о., из геномной ДНК растения сахарной свеклы, его частей или семян методом полимеразной цепной реакции с помощью первого праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, и второго праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4, и/или

в) амплификации фрагмента ДНК размером 270-300 п.о., предпочтительно 288 п.о., из геномной ДНК растения сахарной свеклы, его частей или семян методом полимеразной цепной реакции с помощью первого праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, и второго праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, и/или

г) амплификации фрагмента ДНК размером 710-790 п.о., предпочтительно 751 п.о., из геномной ДНК растения сахарной свеклы, его частей или семян методом полимеразной цепной реакции с помощью первого праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9, и второго праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и/или

д) амплификации фрагмента ДНК размером 990-1100 п.о., предпочтительно 1042 п.о., из геномной ДНК растения сахарной свеклы, его частей или семян методом полимеразной цепной реакции с помощью первого праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, и второго праймера, имеющего нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16.

Способ позволяет легко осуществлять детекцию устойчивого к глифосату трансгенного растения сахарной свеклы посредством стандартных методов молекулярной биологии.

Еще одним объектом изобретения является тест-набор для идентификации устойчивого к глифосату трансгенного растения сахарной свеклы, его клеток, ткани или частей. Набор содержит по крайней мере одну пару праймеров, включающую первый праймер и второй праймер для полимеразной цепной реакции, которые обеспечивают специфичную идентификацию Н7-1, его клеток, ткани или частей.

Первый праймер предпочтительно имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 14, а второй праймер - SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 16.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения как первый праймер, так и второй праймер узнают нуклеотидную последовательность, которая является частью нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5.

Изобретение иллюстрируется следующими фигурами.

Фиг. 1 - карта бинарного вектора PV-BVGT08.

Фиг. 2 - идентификация Н7-1 методом ПЦР. Проведен анализ проб ДНК из 18 растений. Негативный контроль ДНК из нетрансформированной сахарной свеклы; позитивный контроль ДНК из исходного трансформанта Н7-1.

Фиг. 3 - идентификация Н7-1 методом многократной ПЦР и дискриминация трансгенного event Н7-1 и нетрансгенных растений. Проведен анализ проб ДНК из 54 растений.

Фиг. 4 - рFМV-ср2-СР4-EPSPS-E9-3'-встройка и сайты расщепления рестрикционных ферментов HindIII, XbaI, ClaI, PstI и BamHI.

Фиг. 5 - анализ зависимости системы встройка/количество копий в Н7-1. Для Саузерн-блот-анализа 10 мкг геномной ДНК Н7-1 расщепляли с помощью PstI, HindIII, XbaI, ClaI и BamHI (дорожка 3-7). Нетрансформированную геномную ДНК в качестве негативного контроля расщепляли с помощью BamHI (дорожка 8). PV-BVGT08-Плазмиду в качестве позитивного контроля расщепляли с помощью BamHI. Дорожки 2 и 9 являются маркерами размеров. Блот исследовали посредством кодирующей области СР4-EPSPS, меченной <sup>32</sup>P. Зонд представляет собой внутреннюю последовательность гена СР4-EPSPS, положение 447-1555 п.о.

Фиг. 6 - Саузерн-блот-анализ Н7-1 с целью изучения интактности ср2-СР4-EPSPS-кодирующей области. 10 мкг геномной ДНК Н7-1, нетрансгенной контрольной ДНК и нетрансгенной контрольной ДНК, смешанной с PV-BVGT08, расщепляли с помощью XbaI и HindIII/BamHI. Блот исследовали посредством СР4-EPSPS-ПЦР-фрагмента, меченного <sup>32</sup>P. Зонд представляет собой последовательность PV-BVGT08, положение 447-1555 п.о.

Фиг. 7 - Саузерн-блот-анализ Н7-1 с целью изучения интактности области промотора. 10 мкг геномной ДНК Н7-1, нетрансгенной контрольной ДНК и нетрансгенной контрольной ДНК, смешанной с PV-BVGT08, расщепляли с помощью HindIII, XbaI и SacI/XhoI. Блот исследовали фрагментом промотора, меченного <sup>32</sup>P (HindIII)(=последовательность PV-BVGT08, положение 7992-8583) или целой промотор-ср2-СР4-EPSPS-E9-3'-кассетой (PmeI/HhoI)(=последовательность PV-BVGT08, положение 7935-2389 п.о.).

Фиг. 8 - Саузерн-блот-анализ Н7-1 с целью изучения интактности области полиаденилирования. 10 мкг геномной ДНК Н7-1, нетрансгенной контрольной ДНК и нетрансгенной контрольной ДНК, смешанной с PV-BVGT08, расщепляли с помощью EcoRI/PstI, XbaI, HindIII и PstI. Блот исследовали фрагментом E9-31'-полиаденилирования, меченного <sup>32</sup>P (BamHI/XhoI)(=последовательность PV-BVGT08, положение 1702-2389 п.о.).

Фиг. 9 - фрагменты, использованные в качестве зондов для определения отсутствия основной цепи векторной ДНК в Н7-1.

Фиг. 10 - Саузерн-блот-анализ Н7-1 для определения отсутствия основной цепи векторной ДНК в Н7-1. 10 мкг геномной ДНК Н7-1, нетрансгенной контрольной ДНК и нетрансгенной контрольной ДНК, смешанной с PV-BVGT08, расщепляли с помощью XbaI. Блоты исследовали <sup>32</sup>P-меченными зондами, включающими целую основную цепь PV-BVGT08 (зонд 1-4). Один блот исследовали меченным фрагментом СР4-EPSPS.

Фиг. 11 - сравнение фрагментов ПЦР и последовательностей PV-BVGT08 в левосторонней области.

Фиг. 12 - сравнение фрагментов ПЦР и последовательностей PV-BVGT08 в правосторонней области.

Фиг. 13 - анализ геномной ДНК снаружи правостороннего места присоединения встройки. Приблизительно 50 нг геномной ДНК Н7-1, нетрансгенной контрольной ДНК и воды использовали в реакциях ПЦР с комбинацией праймеров Р1, в которой оба праймера локализованы снаружи встройки, и Р3, в которой один праймер локализован внутри встройки, а другой праймер локализован снаружи встройки.

Фиг. 14 - анализ геномной ДНК снаружи левостороннего места присоединения встройки. Приблизительно 50 нг геномной ДНК Н7-1, нетрансгенной контрольной ДНК и воды использовали в реакциях ПЦР с комбинацией праймеров Р2, в которой оба праймера локализованы снаружи встройки, и Р4, в которой один праймер локализован внутри встройки, а другой праймер локализован снаружи встройки.

Фиг. 15 - карта потомств партии семян Н7-1.

Фиг. 16 - анализ Н7-1 методом блоттинга по Саузерну для выявления стабильности интеграции встраиваемой ДНК в геном. 10 мкг геномных ДНК Н7-1 (исходный трансформант Н7-1-1995 и три потомства - Н7-1-1996, Н7-1-1997 и Н7-1-1998) и нетрансгенных контрольных ДНК разного происхождения расщепляли с помощью BamHI, XbaI и HindIII. Блот исследовали <sup>32</sup>P-меченным зондом СР4-EPSPS вектора PV-BVGT08 (=447-1555 п.о.).

Описание изобретения иллюстрируется ссылками на нижеследующие примеры.

|  |  |
|--|--|
|  | Перечень сокращений<br>приблизительно  |
| °C   | градус Цельсия                         |
| bidest   | стерильная вода двойной дистилляции    |
| п.о.   | пара(ы) оснований                      |
| СТАВ   | цети.лтриметиламмонийбромид            |
| ДНК  | дезоксирибонуклеиновая кислота         |
| <i>E. coli</i>   | <i>Escherichia coli</i>                |
| EDTA   | этилендиаминтетрауксусная кислота      |
| Рис.   | рисунок                                |
| ч  | час                                    |
| HCl  | соляная кислота                        |
| кб   | килобаза                               |
| кг   | килограмм                              |
| М, mM  | моль, миллимоль                        |
| мин  | минута                                 |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | фосфат натрия                          |
| NaCl   | хлористый натрий                       |
| NaOH   | едкий натрий                           |
| нк   | нуклеотид                              |
| ПЦР  | полимеразная цепная реакция            |
| пмоль  | пикомоль                               |
| РНК-аза  | рибонуклеаза                           |
| об/мин   | обороты в минуту                       |
| PP   | Раундап Реди®                          |
| кт   | комнатная температура                  |
| SDS  | додецилсульфат натрия                  |
| сек  | секунда                                |
| SEVAG  | хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1) |
| SSC  | стандартный солевой раствор            |
| TE   | трис-EDTA буфер                        |
| TRIS   | трис(гидроксиметил)-аминометан         |

#### Пример 1. Идентификация явления рекомбинации Н7-1.

Сахарную свеклу (*Beta vulgaris*), генотип 3S0057, подвергали генетической модификации для экспрессии CP4-5-енолпирувиллицилат-3-фосфат синтазы или CP4-EPSPS, которая придает устойчивость к гербицидному глифосату и которая также используется в качестве маркера, необходимого для селекции. Эту трансгенную линию продуцировали методом трансформации на основе *Agrobacterium-tumefaciens* с использованием бинарного вектора PV-BVGT08. Т-ДНК вектора, использованного для трансформации сахарной свеклы, содержала между лево- и правосторонним участками следующие последовательности: кодирующую область, включающую последовательность, которая кодирует хлоропластный транзит-пептид из EPSPS *Arabidopsis thaliana* (символ str2), связанную с последовательностью, которая кодирует CP4-EPSPS, под контролем промотора на основе вируса мозаики норичника 35S (pFMV) и 3'-концевую последовательность терминации транскрипции rbcS-E9-гена *Pisum sativum*.

Применяли следующие методы.

#### I. Экстракция ДНК.

##### Метод 1.

Брали свежий лист или другую ткань (20-100 мг), помещали в 1,5 мл пробирку и добавляли 400 мкг

экстракционного буфера (см. ниже). Ткань измельчали небольшим пестиком. Смесь взбалтывали 5 с и инкубировали 30-60 мин при комнатной температуре. Затем проводили центрифугирование в течение 1 мин при 13000 об./мин. Супернатант, содержащий ДНК, переливали в другую 1,5 мл пробирку и смешивали с 320  $\mu$ л изопропанола. Смесь инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. После добавления этанола образуется осадок ДНК. Этанол декантировали после центрифугирования в течение 5 мин при 13000 об./мин. Пробу оставляли для просушки на воздухе. Гранулы повторно растворяли в 400  $\mu$ л  $H_2O$  или TE-буфера (см. ниже).

Экстракционный буфер (100 мл).

20 мл 1 М трис(pH 7,5)

5 мл 5 М NaCl

5 мл 0,5 М EDTA

2,5 мл 20% SDS

67,5 мл  $H_2O$

TE-буфер.

10 mM трис-HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA

Метод 2.

Брали свежий растительный материал (20-100 мг), помещали в пробирку объемом 1,5 мл Эппендорфа и добавляли 500  $\mu$ л СТАВ-буфера (65°C) (см. ниже). Смесь инкубировали в течение 1-1,5 ч при 65°C и затем центрифугировали 5 с. Добавляли 5 мл РНК-азы А (10 мг/мл). Полученную смесь инкубировали 30 с при 37°C и затем центрифугировали в течение 5 с. Добавляли 200  $\mu$ л SEVAG. После перемешивания и центрифугирования при 13000 об./мин в течение 10 мин супернатант помещали в другую пробирку объемом 1,5 мл. С супернатантом осторожно смешивали 1 объем изопропанола (около 400  $\mu$ л). После этого проводили центрифугирование при 13000 об./мин в течение 10 мин. Добавляли 600  $\mu$ л этанола. Гранулы промывали путем переворачивания пробирки несколько раз. Смесь снова центрифугировали при 13000 об./мин в течение 2 мин. Этанол осторожно сливали. Пробирку переворачивали и давали стечь содержимому на чистую бумагу. Пробу высушивали на воздухе в течение 15 мин. Гранулы повторно растворяли в 50  $\mu$ л воды (см. ниже).

СТАВ-буфер.

1,4 М NaCl

20 mM EDTA

100 mM трис-HCl

2% (в/об) СТАВ

SEVAG.

Хлороформ:изоамиловый спирт (24:1).

РНК-азный буфер.

10 mM трис, 15 mM NaCl, pH 7,5

РНК-аза А

10 мг РНК-аза/мл РНК-азный буфер

(5  $\mu$ л bidest+50 мг РНК-аза А, алиquotы в пробирках объемом 1,5 мл, кипячение пробирок в течение 30 мин при 100°C, хранение при - 20°C)

Обычно применяли метод 1. Данный метод позволяет экстрагировать большое количество проб ДНК в день, при этом качество ДНК приемлемое. Метод 2 применяли в случаях, когда листовой материал был старым или когда возникали проблемы с качеством ДНК. Этот метод более сложен, требует больше времени и дает меньший выход ДНК, но более высокого качества.

Количественное определение ДНК не проводили, и в полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали от 0,5 до 1 мл раствора экстрагированной ДНК.

II. Полимеразная цепная реакция.

Для реакций ПЦР готовили 10-кратную буферную смесь, состоящую из буфера+dNTP. Применяли следующую процедуру.

| Основной буфер          | Объем  | 10хбуфер<br>конц. | Заключительная<br>реакция ПЦР<br>конц. |
|-------------------------|--------|-------------------|--|
| 1М трис-HCl,<br>pH 8,3  | 100 μл | 0,1 М             | 10 мМ трис-HCl,<br>pH 8,3              |
| 1М KCl                  | 500 μл | 0,5 М             | 50 мМ KCl                              |
| 100мМ dATP              | 20 μл  | 2 мМ              | 0,2 мМ dATP                            |
| 100мМ dCTP              | 20 μл  | 2 мМ              | 0,2 мМ dCTP                            |
| 100мМ dTTP              | 20 μл  | 2 мМ              | 0,2 мМ dTTP                            |
| 100мМ dGTP              | 20 μл  | 2 мМ              | 0,2 мМ dGTP                            |
| 100мМ MgCl <sub>2</sub> | 100 μл | 15 мМ             | 1,5 мМ MgCl <sub>2</sub>               |
| HPLC вода               | 170μл  |                   |  |
| Всего 1000 μл           |        |                   |  |

Реакция ПЦР (25 μл).

|                  |  |
|------------------|--|
| ДНК              | 0,5 μл   |
| Праймер 1        | 1 μл (20 пмоль)  |
| Праймер 2        | 1 μл (20 пмоль)  |
| Тақ полимераза 1 | 0,2 μл (1 U, Oncor Appligene S.A.,<br>Гейдельберг, Германия) |
| Буфер 10 х конц. | 2,5 μл   |
| Вода             | 18,8 μл  |

III. Идентификация Н7-1 методом ПЦР.

Идентификацию Н7-1 осуществляли методом ПЦР с использованием сайтспецифичных праймеров.

Верхний праймер (SEQ ID NO: 1):

Н7-207030: 5' TTA ATT TTT GCA GGC GAT GGT GGC TGT TAT 3'

Нижний праймер (SEQ ID NO: 2):

Н7-841L30: 5' CAT ACG CAT TAG TGA GTG GGC TGT CAG GAC 3'

Верхний праймер локализован снаружи встройки и является частью геномной ДНК сахарной свеклы. Нижний праймер локализован внутри встроеного гена CP4-EPSPS.

Условия проведения ПЦР.

|                    |                |         |
|--------------------|----------------|---------|
| 94 °С              | 4 мин          | Этап 1  |
| 95 °С              | 30 сек         | Этап 2а |
| 55 °С              | 30 сек         | Этап 2б |
| 72 °С              | 2 мин          | Этап 2в |
| 72 °С              | 5 мин          | Этап 3  |
| 4 °С               | в течение ночи | Этап 4  |
| завершение реакции |                |         |

Этапы 2а-в повторяли 34 раза.

Предполагаемый продукт ПЦР - фрагмент ДНК размером 664 п.о. (SEQ ID NO: 13, см. фиг. 2).

IV. Идентификация Н7-1 методом многократной ПЦР.

Для дифференцировки нетрансгенных и трансгенных растений, как гомозиготных, так и геми/гетерозиготных, проводили многократную ПЦР с тремя различными праймерами. Были использованы следующие праймеры.

H72 (SEQ ID NO: 14): 5' GCTCTGACACAACCGGTAATGCATTGGCC 3'  
 H7S2 (SEQ ID NO: 15): 5' GACCCATAGTTTGTATTTAAGCACGACATG 3'  
 H7R2 (SEQ ID NO: 16): 5' GCAGATTCTGCTAACTTGCGCCATCGGAG 3'

Условия ПЦР.

|       |                |         |
|-------|----------------|---------|
| 94 °C | 2 мин          | Этап 1  |
| 94 °C | 1 сек          | Этап 2а |
| 60 °C | 45 сек         | Этап 2б |
| 72 °C | 90 сек         | Этап 2в |
| 72 °C | 5 мин          | Этап 3  |
| 4 °C  | в течение ночи | Этап 4  |

#### завершение реакции

Этапы 2а-в повторяли 34 раза.

Нетрансгенные растения проявляют только один фрагмент ПЦР размером 350 п.о. Гомозиготные трансгенные растения - один фрагмент размером около 1042 кб. Гетерозиготные растения проявляют оба фрагмента (см. фиг. 3).

Пример 2. Характеристика Н7-1.

Для характеристики интегрированной в Н7-1 ДНК проводили молекулярный анализ. В частности, определяли количество встроок (количество сайтов интеграции внутри генома сахарной свеклы), количество копий (количество фрагментов ДНК внутри одного локуса), целостность встроеной кодирующей области и ее регуляторных элементов, последовательность рFMV-промотора и последовательность E9-3'-концевой терминации транскрипции, отсутствие последовательностей основной цепи в векторе, который использовали для трансформации, а также стабильность наследования встройки. Кроме того, были идентифицированы последовательности, фланкирующие встройку ДНК.

Определение характеристик встроеной ДНК Н7-1, полученной в результате трансформации сахарной свеклы, осуществляли с применением методов Саузерн-блоттинга, ПЦР и инвертированной ПЦР. Это включало также позитивный и негативный контроль (PV-BVGT08, ДНК нетрансгенного растения), который осуществляли теми же методами, что и определение характеристик исследуемого вещества (Н7-1).

ДНК выделяли из партии № 749034 растений Н7-1, выращенных в 1997г. ДНК выделяли также из исходного трансформанта Н7-1/3S0057 (=6401 VH), выращенного в 1995г., и из дополнительных потомств, выращенных в 1996, 1997 и 1998г. (Н7-1/64801Н, Р7-1/74922Н и Н7-1/83002S).

Нетрансгенная линия сахарной свеклы 3S0057 служила в качестве контроля. Кроме того, линии сахарной свеклы 5R7150, 8K1180 и 6S0085 использовали в качестве негативного контроля. Это обычные нетрансгенные линии, которые используются для выращивания традиционной сахарной свеклы.

Эталонные вещества соответствуют плазмиде PV-BVGT08, использованной для трансформации. Плазмидную ДНК смешивали с ДНК из контрольной линии сахарной свеклы, расщепляли рестрикционным ферментом и разделяли методом электрофореза в агарозном геле параллельно с исследуемыми веществами. Плазида служила в качестве маркера для определения размера предполагаемого фрагмента, а также в качестве позитивного контроля гибридизации. Для демонстрации чувствительности метода блоттинга по Саузерну плазмидную ДНК смешивали с геномной ДНК растения в концентрации менее 1 копии анализируемого элемента (~10 мкг геномной ДНК и ~28 пг PV-BVGT08-ДНК). Устанавливали размеры с использованием маркера для определения молекулярных размеров RAOUL™ (фирма ONCOR/Appligene, каталог № 160673).

Выделение ДНК.

Растительную ткань (1-3 г сырого веса) из партии № 74903Н Н7-1 растирали в жидком азоте в мелкий порошок, используя ступку и пестик. Порошок переносили в 50 мл пробирку Оукриджа и добавляли 7,5 мл предварительно нагретого (60°C) СТАВ-буфера (2%-ный СТАВ, 1,4М NaCl и 0,2%-ный меркаптоэтанол). Пробы инкубировали при 65°C в течение приблизительно 30 мин при непрерывном перемешивании. К пробам добавляли равный объем (8 мл) смеси RT хлороформ:изоамиловый спирт (24:1 об./об.). Суспензию перемешивали путем инверсии. Используя центрифугирование (10 мин, 9000 об./мин), отделяли две фазы. Водную фазу переносили в другую пробирку Оукриджа объемом 50 мл и затем осаждали ДНК добавлением 5 мл изопропанола. ДНК раздробляли центрифугированием (2 мин, 9000 об./мин) и удаляли супернатант. Осажденную ДНК инкубировали с промытым раствором, состоящим из 76% этанола и 10 мМ ацетата аммония, в течение около 20 мин. После центрифугирования и декантирования супернатанта ДНК высушивали в вакууме и повторно растворяли в ТЕ (рН 8,0) при 4°C в течение ночи.

В качестве альтернативного метода ДНК выделяли с использованием набора Dneasy Plant Maxi фирмы Qiagen (Дюссельдорф, Германия, каталог № 68163). Выделение ДНК проводили согласно инструкциям производителя.

В качестве дополнительного альтернативного метода ДНК выделяли с использованием набора

Dneasy Plant Maxi фирмы Qiagen (Дюссельдорф, Германия, каталог № 69103). Выделение ДНК проводили согласно инструкциям производителя.

Количественное определение ДНК и расщепление рестрикционными ферментами.

Количество ДНК определяли с использованием LKB Biochrom UV/visible спектрофотометра (фирма Amersham Pharmacia, Фрейбург, Германия) или, альтернативным путем, определение количества ДНК осуществляли после электрофореза в агарозном геле сканированием ДНК с помощью компьютерной программы RFLPscan (фирма MWG-Biotech, Эберсберг, Германия). В качестве калибровочного стандарта использовали High DNA Mass Ladder фирмы Gibco/Life Technologies (Карлсруэ, Германия, каталог № 10496-016). Рестрикционные ферменты приобретали у фирм Boehringer Mannheim (Маннхайм, Германия), Stratagene (Амстердам, Нидерланды) и New England Biolabs (Франкфурт, Германия) и применяли в соответствии с инструкциями изготовителя.

Приготовление зонда ДНК.

ДНК плазмиды PV-BVGT08 выделяли из культур *E. coli*. Матрицы зонда, гомологичные кодирующей области CP4-EPSPS, 35S-промотору, области E9-3'-полиаденилирования, <sup>35</sup>S-ctp2-CP4-EPSPS-E9-3'-кассете и боковым областям, приготавливали путем расщепления соответствующими рестрикционными ферментами с последующим разделением методом электрофореза в агарозном геле или полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукты очищали, используя набор Gene Clean II фирмы Bio 101 (Ла Джолла, Калифорния). Зонды (25 пг) метили 32P-dCTP или 32P-dATP, используя систему для мечения ДНК Megaprime™ фирмы Amersham-Pharmacia Biotech Europe (Фрайбург, Германия).

Саузерн-блот-анализы.

Пробы ДНК, обработанные рестрикционными ферментами, разделяли методом электрофореза в агарозном геле ≈15 ч при ≈35 в. После фотографирования геля ДНК очищали посредством замачивания геля в течение 15 мин в растворе 0,25M HCl, денатурировали инкубированием геля в течение 30 мин в денатурационном растворе, содержащем 0,5M NaOH, 1,5M NaCl, при постоянном перемешивании и в конце нейтрализовали посредством замачивания в течение 2 ч в нескольких объемах раствора, содержащего 2M NaCl и 1M трис-HCl, pH 5,5. ДНК из агарозных гелей переносили на нейлоновые мембраны Hybond™ (Amersham-Pharmacia Biotech Europe, Фрайбург, Германия), используя PosiBlot Pressure блоттер фирмы Stratagene в соответствии с протоколом изготовителя. После замачивания фильтров в течение 15 мин в 2-кратном SSPE (20-кратный SSPE: 3,6M NaCl, 20 mM EDTA, 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4) ДНК фиксировали на мембране путем облучения ультрафиолетом (Transilluminator Pharmacia, Фрайбург, Германия) в течение 0,1 мин и упаривания под вакуумом 1 ч при 80°C. Блоты предгибридизовали 4 ч в водном растворе 50%-ного формамида, 5-кратного SSC, 0,1%-ного лаурилсаркозина, 0,02%-ного SDS и 2%-ного блокирующего реагента (Boehringer Mannheim, Германия, каталог № 1096176). Гибридизацию с радиоактивно меченным зондом проводили в свежем предгибридизационном растворе в течение 16-18 ч при 42°C. После гибридизации мембраны промывали 5 мин в 2-кратном SSC, 1%-ном SDS при 65°C и 2 раза по 15 мин в 0,2-кратном SSC, 0,1%-ном SDS при 68°C. Авторадиографическое изображение блотов получали путем экспонирования блотов на пленку Kodak Biomax MST™ с использованием интенсифицирующих экранов Kodak Biomax MST™.

Идентификация геномных 5'- и 3'-фланкирующих последовательностей.

Место сшивки трансген-растение геномной ДНК идентифицировали методом инвертированной ПЦР. Геномную ДНК очищали, как описано выше. Приблизительно 1 мкг ДНК расщепляли в отдельных реакциях рестрикционными нуклеазами TaqI, AluI, NdeIII или RsaI. Расщепленные ДНК-фрагменты повторно лигировали T4-лигазой в течение ночи, после чего проводили полимеразную цепную реакцию. Получали различные комбинации инвертированных праймеров, используя пакеты программ для анализа праймеров OLIGO® (National Biosciences, Inc., Плимут, Мичиган).

Фрагменты, полученные в результате этой инвертированной ПЦР-амплификации, разделяли гелем электрофорезом, вырезали из геля и подвергали очистке с использованием набора Gene Clean II™. Очищенные фрагменты клонировали в вектор pCR® 2.1 TOPO™TA фирмы Invitrogen (Гренинген, Нидерланды). Встройки направляли для секвенирования на фирму MWG-Biotech (Эберсберг, Германия). Полученные данные о последовательностях анализировали с использованием пакетов программ для анализа ДНК Mac Molly® Tetra (Soft Gene GmbH, Бухольд, Германия).

Анализ методом ПЦР.

Геномную ДНК готовили, используя комплект Plant DNAeasy Plant Mini (Qiagen, Дюссельдорф, Германия) в соответствии с инструкциями изготовителя. Для ПЦР использовали приблизительно 50 нг геномной ДНК. Реакции проводили 30 с при 95°C, 30 с при 55°C и 35 циклов в течение 2 мин при 72°C. ПЦР выполняли на циклере PTC200 (Biozym, Ольдендорф, Германия). Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в агарозном геле.

1. Количество встроок.

Для Н7-1 определяли количество встроок и количество сайтов интеграции трансгенной ДНК в геном сахарной свеклы. Чтобы установить количество встроок, геномную ДНК расщепляли рестрикционными ферментами HindIII, XbaI и BamHI. В качестве негативного контроля ДНК из нетрансформирован-

ного контрольного растения, представляющего собой ту же генетическую линию, расщепляли с помощью HindIII. В качестве позитивного контроля использовали ДНК вектора трансформации (PV-BVGT08).

XbaI и BamHI расщеплялись только 1 раз в PV-BVGT08 и не расщеплялись внутри меченого зонда CP4-EPSPS, который использовали (см. фиг. 4). HindIII расщеплялся 3 раза в PV-BVGT08, но все три сайта локализованы снаружи зонда и на том же 5'-конце относительно зонда. Таким образом, каждый фермент предположительно высвобождает один фрагмент ДНК, который гибридизуется с зондом CP4-EPSPS, и, по-видимому, содержит часть встроенной ДНК и прилегающей геномной ДНК растения. Число детектированных фрагментов указывает на количество присутствующих в Н7-1 встроок. Результаты приведены на фиг. 5.

После расщепления посредством HindIII, XbaI и BamHI обнаруживали только один гибридизационный фрагмент соответственно. Фрагменты размером 5,2 кб, полученные в результате расщепления с помощью HindIII (дорожка 4), 4кб - с помощью XbaI (дорожка 5) и приблизительно 11 кб - с помощью BamHI, показывают, что трансформант Н7-1 является единственным явлением интеграции (фиг. 4). Сильный сигнал на дорожке 1 представляет линейаризованную плазмиду PV-BVGT08. Дополнительные слабые сигналы относятся к небольшим количествам нерасщепленной PV-BVGT08 или являются неспецифическими фоновыми сигналами гибридизации.

## 2. Количество копий.

Теоретически, один сайт интеграции может содержать более 1 копии встроенной ДНК. Однако, учитывая размер фрагментов ДНК, полученных в результате рестриционного анализа, как показано выше, это невозможно. Если бы Н7-1 включал более 1 копии встроенной ДНК, были бы обнаружены дополнительные фрагменты. Это подтверждали также и результаты расщепления рестриционным ферментом PstI. PstI расщепляется дважды внутри лево- и правосторонних последовательностей. Один из рестриционных сайтов находится внутри кодирующей области CP4-EPSPS, поэтому после расщепления можно было бы предполагать наличие двух фрагментов гибридизации с CP4-EPSPS-зондом. Один из фрагментов предположительно соответствует внутреннему фрагменту размером около 1,2 кб. Второй фрагмент предположительно является боковым фрагментом. Итак, в случае более одной копии были бы обнаружены дополнительные фрагменты. Но результаты показывают, что PstI разрезает ДНК, как предполагалось. Были обнаружены внутренний фрагмент размером 1,2 кб и только один дополнительный фрагмент размером около 4,9 кб (фиг. 5; дорожка 3, фиг. 4).

В качестве дополнительного внутреннего контроля ДНК расщепляли с помощью ClaI (фиг. 5, дорожка 6, фиг. 4). Как предполагалось, гибридизовался один фрагмент размером 2,4 кб, так как ClaI расщеплялся дважды, но снаружи слева и справа от использованного фрагмента CP4-EPSPS. Это также доказывает интактность интегрированного фрагмента ДНК и согласуется с нижеследующими результатами.

Как предполагалось, гибридизация плазмиды PV-BVGT08 с фрагментом CP4-EPSPS дает сигнал в 8,6 кб (дорожка 1) (PV-BVGT08=8590 п.о.). Вторая меньшая и очень слабая полоса является результатом неполной рестрикции PV-BVGT08.

Таким образом, результаты экспериментов показывают, что трансформированная линия сахарной свеклы Н7-1 содержит единственную копию интеграции Т-ДНК плазмиды PV-BVGT08 в геном растения.

## 3. Интактность кодирующей области.

Целостность генной кассеты CP4-EPSPS относительно отдельных элементов (P-FMV-промотора, стр2-CP4-EPSPS-кодирующей области и E9 3'-концевого нетранслируемого участка) определяли расщеплением при помощи ферментов HindIII для P-FMV, HindIII плюс BamHI для стр2-CP4-EPSPS и EcoRI плюс PstI для E9 3'-концевого нетранслируемого участка. Проводили дополнительные эксперименты с использованием SacI плюс XbaI для P-FMV-стр2-CP4-EP8P8-области и E9 3'-концевого участка. Плазмидную ДНК, смешанную с ДНК нетрансгенной сахарной свеклы, и отдельно ДНК нетрансгенной сахарной свеклы расщепляли теми же ферментами в качестве позитивного и негативного контроля соответственно.

Эти ферменты расщепляются внутри предполагаемой встройки ДНК, между левой и правой сторонами Т-ДНК (см. плазмидную карту на фиг. 1), поэтому в случае, если соответствующие элементы являются интактными, то размер гибридизующихся фрагментов должен быть идентичным в ДНК Н7-1 и ДНК PV-BVGT08.

В качестве дополнительного контроля ДНК расщепляли посредством XbaI. XbaI расщеплялся 1 раз между промотором и стр2-CP4-EPSPS-кодирующей областью. Таким образом, можно сделать предположение, что ДНК PV-BVGT08 дает фрагмент размером 8,6 кб, а в случае с Н7-1 - боковой фрагмент, размер которого отличается от размера фрагмента PV-BVGT08. Результаты показаны на фиг. 6, 7 и 8.

Фиг. 6: расщепление ферментами HindIII и BamHI высвобождало ген CP4-EPSPS, блот исследовали фрагментом CP4-EPSPS, генерированным методом ПЦР. Негативный контроль (дорожка 6) не обнаруживал полос гибридизации. Геномная ДНК из Н7-1 и плазмиды PV-BVGT08, смешанная с нетрансгенной ДНК, давали фрагмент размером приблизительно 1,7 кб, что соответствует предполагаемому размеру. В результате расщепления ферментом XbaI получали предполагаемый фрагмент размером 8,6 кб линейаризованной PV-BVGT08. Что касается Н7-1, расщепление давало боковой фрагмент размером приблизи-

тельно 4,0 кб (см. также фиг. 4 и 5). Негативный контроль, как и прежде, не выявлял каких-либо сигналов.

Фиг. 7: расщепление ферментом HindIII высвобождало промотор на основе вируса мозаики норичника, блот исследовали фрагментом промотора, генерированного методом ПЦР. Негативный контроль (дорожка 5) не обнаруживал сигналов гибридизации. Геномная ДНК из Н7-1 и плазида PV-BVGT08, смешанная с нетрансгенной ДНК, давали фрагмент гибридизации размером приблизительно 0,6 кб. Этот размер соответствует предполагаемому размеру промотора (дорожки 4 и 6).

Расщепление ферментом XbaI давало предполагаемый фрагмент размером 8,6 кб линейаризованной PV-BVGT08 и левосторонний фрагмент размером приблизительно 1,3 кб (дорожки 1 и 3) из Н7-1. Этот фрагмент размером 1,3 кб еще раз доказывает, что Н7-1 содержит только одну копию трансгена. Негативный контроль (дорожка 2) не выявлял каких-либо сигналов.

Расщепление с помощью SacI/XhoI высвобождало область промотора вместе с кодирующей областью CH4-EPSPS и областью полиаденилирования. Гибридизация с целой кассетой промотор-стр2-CP4-EPSPS-сигнал полиаденилирования (PmcI/XhoI-фрагмент) давала предполагаемый промотор-стр2-CP4-EPSPS размером 2,3 кб и сигнальные фрагменты полиаденилирования размером 0,7 кб как с ДНК PV-BVGT08, смешанной с нетрансгенной ДНК, так и с геномной ДНК Н7-1 (дорожки 9 и 11).

Фиг. 8: расщепление ферментами PstI и EcoRI высвобождало E9-3'-концевой сигнал полиаденилирования, блот исследовали фрагментом сигнала полиаденилирования. Негативный контроль (дорожка 3) не обнаруживал полос гибридизации. Плазида PV-BVGT08, смешанная с нетрансгенной ДНК, и геномная ДНК из Н7-1 продуцировали фрагмент размером приблизительно 0,6 кб, что соответствует предполагаемому размеру. В результате расщепления ферментом XbaI получали предполагаемый фрагмент размером 8,6 кб линейаризованной плазмиды PV-BVGT08 и боковой фрагмент с Н7-1 размером приблизительно 4,0 кб.

Расщепление ферментом PstI высвобождало E9-3'-концевой сигнал полиаденилирования, связанный с 3'-концом размером 0,5 кб кодирующей области CP4-EPSPS. Получаемый в результате фрагмент размером 1,2 кб обнаруживали, как предполагалось, с геномной ДНК Н7-1, а также с ДНК PV-BVGT08.

В результате расщепления HindIII получали фрагмент размером приблизительно 8,0 кб линейаризованной PV-BVGT08 минус фрагмент промотора (дорожка 13) и боковой фрагмент размером 5,2 кб (дорожка 11) с Н7-1. Единственный фрагмент размером 5,2 кб, полученный в результате расщепления ферментом HindIII, и единственный фрагмент размером 4,0 кб, полученный в результате расщепления ферментом XbaI, еще раз подтверждают, что Н7-1 содержал только одну копию встроенной ДНК. Негативный контроль не выявлял каких-либо сигналов.

Таким образом, результаты изучения блотов подтверждают тот факт, что все элементы перенесенной ДНК являются интактными и что Н7-1 содержит единственную интактную кодирующую область стр2-CP4-EPSPS с регуляторными элементами, область rFMV-промотора и E9-3'-концевую последовательность терминации транскрипции.

#### 4. Анализ для обнаружения фрагментов основной цепи.

Область основной цепи Ti-плазмиды определяется как область снаружи T-ДНК, ограниченной левыми и правосторонними последовательностями, которая состоит из ori-генов и селекционных генов для бактериальной репликации и бактериальной селекции и которая обычно не переносится в геном растения в результате трансформации на основе Agrobacterium. Для подтверждения отсутствия основной цепи векторной ДНК в Н7-1 геномную ДНК из Н7-1 из нетрансформированного контроля и геномную ДНК из Н7-1, смешанную с ДНК PV-BVGT08, расщепляли рестрикционным ферментом XbaI и исследовали тремя перекрывающимися ПЦР-генерированными зондами, которые включали целую последовательность основной цепи. Четвертый зонд содержал целую последовательность основной цепи в одном фрагменте.

Использованные зонды представляют собой последовательность основной цепи (см. фиг. 9).

1. 2730-5370 п.о.
2. 5278-6419 п.о.
3. 6302-7851 п.о.
4. 2730-7851 п.о.

На фиг. 10 показаны результаты Саузерн-блот-анализа.

Дорожки 6, 10, 14 и 18: расщепление геномной ДНК Н7-1, исследованной фрагментами основной цепи из целой цепи, не выявило каких-либо полос гибридизации. Только дорожки 4, 8, 12, 16 и 20 (геномная ДНК, смешанная с ДНК PV-BVGT08) давали полосы размером 8,6 кб, как предполагалось. Полосы представляют собой линейаризованную ДНК PV-BVGT08.

Дорожки 2 и 4: геномная ДНК Н7-1 и геномная ДНК Н7-1, смешанная с PV-BVGT08 и гибридизированная с CP4-EPSPS, давали сигналы гибридизации. Полоса 4 кб на дорожке 2 представляет собой правосторонний фрагмент, две полосы на дорожке 4 представляют собой правосторонний фрагмент в 4,0 кб и линейаризованную плазмиду PV-BVGT08 длиной 8,6 кб. Обе полосы имеют одинаковую интенсивность. Это убедительно показывает, что концентрация добавленной ДНК PV-BVGT08 сравнима с концентрацией элемента CP4-EPSPS в ДНК Н7-1. Концентрация использованной плазмидной ДНК эквивалентна 0,5 копий. Если бы в геном Н7-1 интегрировались последовательности основной цепи, обнаруживались бы четкие сигналы.

Приведенные результаты доказывают, что Н7-1 не содержит какой-либо детектируемой последовательности основной цепи плазмиды, использованной для трансформации. Эти результаты также подтверждаются данными анализа 5'- и 3'-фланкирующих геномных областей (см. ниже).

#### 5. Идентификация 5'- и 3'-фланкирующих геномных последовательностей.

Трансформация на основе *Agrobacterium* обычно приводит к интеграции всех последовательностей между левой и правой сторонами в геном растения. 5'- и 3'-концы интегрированной плазмидной ДНК предположительно должны быть внутри или около лево- или правосторонних последовательностей, соответственно. Идентификацию этих областей осуществляли методом инвертированной ПЦР. Клонированные продукты ПЦР секвенировали и результаты секвенирования сравнивали с последовательностью PV-BVGT08.

На фиг. 11 показано выравнивание последовательности клонированного методом инвертированной ПЦР фрагмента (D1U.RPT) (=геном Н7-1, верхняя последовательность), полученного с помощью праймеров для анализа левосторонней области, против последовательности PV-BVGT08 (нижняя последовательность). Сравнение этих двух последовательностей выявило прерывание гомологии как раз внутри боковой последовательности.

На фиг. 12 показано выравнивание последовательности клонированного методом инвертированной ПЦР фрагмента (B3UNI.RPT) (=геном Н7-1, верхняя последовательность), полученного с помощью праймеров для анализа правосторонней области, против последовательности PV-BVGT08 (нижняя последовательность).

Сравнение этих двух последовательностей выявило прерывание гомологии уже за 18 нуклеотидов до боковой последовательности.

Таким образом, убедительно показано, что последовательность между левой и правой сторонами Ti-плазмиды PV-BVGT08 интегрирована правильно. Последовательность прерывалась внутри или непосредственно до боковых сторон. Эти данные подтверждают результаты анализа основной цепи, а именно то, что в геном Н7-1 не интегрировались последовательности основной цепи снаружи боковых областей.

Чтобы установить, являются ли фланкирующие последовательности на правой или левой стороне встройки в Н7-1 сахарной свеклы интактными последовательностями генома растения, проводили анализ методом ПЦР с комбинациями праймеров P1, P2, P2 и P4.

Праймеры P1 и P2 из комбинации праймеров локализованы снаружи встройки. Если ДНК встроенного локуса внутри Н7-1 идентична ДНК нетрансформированного контроля, то результатом ПЦР предположительно должны быть два фрагмента ПЦР, являющиеся синтезом обоих праймеров. Праймеры P3 и P4 из комбинации праймеров сконструированы таким образом, что один из этих праймеров локализован внутри встройки CP4-EPSPS, а другой - снаружи встройки внутри геномной ДНК растения. Поэтому в результате ПЦР предположительно должны продуцироваться фрагменты только из ДНК Н7-1.

Данные о последовательности, полученные методом инвертированной ПЦР, вместе с данными из вектора PV-BVGT08 дают последовательность, которая включает встройку Н7-1 (PV-BVGT08 последовательность), право- и левосторонние участки присоединения и дополнительную геномную ДНК сахарной свеклы (SEQ ID NO: 5).

Для идентификации трансген-растение присоединений геномной ДНК (идентификации сайтспецифичности) и участков геномной ДНК на левой и правой сторонах встройки использовали следующие праймеры.

Комбинация P1 (праймер для анализа геномной ДНК снаружи правосторонней боковой области).

Верхний праймер: 5' CGG TAA ATG CAT TGG CGT TTG TT

Нижний праймер: 5' CAC CCA GAT CCC AAT AAA ACC GTA AT

Предполагаемый продукт ПЦР 241 п.о.

Комбинация P2 (праймер для анализа геномной ДНК снаружи левосторонней боковой области, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21).

Верхний праймер: 5' AAA TGG TTG TAG ATA AAT AAG GAA ATC A

Нижний праймер: 5' ACA TGT TTG AGC ACT CTT CTT GT

Предполагаемый продукт ПЦР 377 п.о.

Комбинация P3 (праймер для анализа трансген-растение присоединения геномной ДНК, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8).

Верхний праймер: 5' ATG CAT TGG CCT TTG TTT TTG AT

Нижний праймер: 5' TGT CGT TTC CCG CCT TCA G

Предполагаемый продукт ПЦР 288 п.о. (SEQ ID NO: 11).

Комбинация P4 (праймер для анализа трансген-растение присоединения геномной ДНК, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10).

Верхний праймер: 5' CGC TGC GGA CAT CTA CAT TTT TGA AT

Нижний праймер: 5' AGT TAA CTT TCC ACT TAT CGG GGC ACT G

Предполагаемый продукт ПЦР 751 п.о. (SEQ ID NO: 12).

Эксперименты методом ПЦР с ДНК Н7-1 и ДНК из нетрансгенного контрольного растения с использованием комбинации праймеров P3, в которой один из праймеров локализован внутри встройки Н7-

1, давали фрагмент только с ДНК Н7-1. И, наоборот, эксперименты методом ПЦР с использованием комбинации праймеров Р1, гомологичной последовательностям снаружи встройки, давали фрагменты как с ДНК Н7-1, так и с ДНК нетрансгенного контроля. Результаты этих экспериментов представлены на фиг. 13.

Из этих результатов видно, что последовательность, прилежащая к правостороннему месту присоединения встройки, присутствует в ДНК трансгенного Н7-1 и в ДНК из нетрансгенных растений. Из этого можно заключить, что ДНК снаружи встройки Н7-1 является нетрансгенной геномной ДНК.

Эксперименты методом ПЦР с ДНК Н7-1 и ДНК из нетрансгенного контрольного растения с использованием комбинации праймеров Р4, в которой один из праймеров локализован внутри встройки СР4-EPSPS, давали фрагмент только с ДНК Н7-1. Наоборот, эксперименты методом ПЦР с использованием комбинации праймеров Р2, гомологичной последовательностям снаружи встройки, давали фрагменты как с ДНК Н7-1, так и с нетрансгенной контрольной ДНК. См. эти результаты на фиг. 13.

Результаты показывают, что последовательность, прилежащая к левостороннему месту присоединения встройки, присутствует в ДНК трансгенного Н7-1 и в ДНК из нетрансгенных растений. Из этого можно заключить, что ДНК снаружи левостороннего места присоединения является нетрансгенной геномной ДНК.

Таким образом, можно сказать, что последовательности снаружи встройки Н7-1 сахарной свеклы идентичны последовательностям, присутствующим в нетрансгенных растениях. Из этого можно сделать вывод, что эти последовательности являются последовательностями генома растения, присутствующими в родительской линии, использованной для трансформации, и в других традиционных линиях сахарной свеклы.

#### 6. Стабильность через поколения.

Для демонстрации стабильности интегрированной ДНК исходный трансформируемый Н7-1 сравнивали с тремя потомствами (64801Н, 74922Н и 83002S; см. фиг. 15) этой линии, полученной в результате самоопыления нетрансгенными линиями сахарной свеклы. Исходная трансформированная линия и потомства были получены в 1995, 1996, 1997 и 1998гг.

В качестве контроля анализировали четыре различные линии нетрансгенной сахарной свеклы (3S0057, 5R7150, 8K1180, 6S0085). Все ДНК расщепляли XbaI, HindIII и BamHI соответственно и гибридизовали с меченым фрагментом СР4-EPSPS. Чтобы показать, что Т-ДНК стабильно интегрировалась в геном растения, все дорожки потомств Н7-1, расщепляемые теми же рестрикционными ферментами, предположительно должны давать полосу точно такого же размера.

Все ДНК из потомств Н7-1 на дорожках 3-6 дают предполагаемые фрагменты: ДНК, расщепленная с помощью BamHI, давала полосы размером около 11 кб, расщепления посредством XbaI продуцировали фрагменты размером 4,0 кб и посредством HindIII - полосы размером 5,2 кб. Все полосы, полученные с помощью одинаковых рестрикционных ферментов, но в разные годы, были идентичными по размеру. Никакие нетрансгенные линии не давали каких-либо сигналов (фиг. 16).

Эти результаты показывают, что интродуцированная последовательность стабильно интегрируется в геномную ДНК и стабильно наследуется.

Протокол последовательностей - свободный текст.

#### SEQ ID: 5

<223>: Встроенная ДНК с фланкирующими 3'- и 5'-последовательностями

#### SEQ ID: 6

<223>: ПЦР-продукт

#### SEQ ID: 11

<223>: ПЦР-продукт

#### SEQ ID: 12

<223>: ПЦР-продукт

#### SEQ ID: 13

<223>: ПЦР-продукт

#### SEQ ID: 17

<223>: ПЦР-продукт

## Перечень последовательностей

|       |  |    |
|-------|--|----|
| <110> | КВС СААТ АГ                            |    |
| <120> | Устойчивая к глифосату сахарная свекла |    |
| <130> | PCT 0079                               |    |
| <150> | EP 03003866.5                          |    |
| <151> | 2003-02-20                             |    |
| <150> | US 10/376763                           |    |
| <151> | 2003-02-28                             |    |
| <160> | 21                                     |    |
| <170> | PatentIn version 3.1                   |    |
| <210> | 1                                      |    |
| <211> | 30                                     |    |
| <212> | DNA                                    |    |
| <213> | Artificial Sequence                    |    |
| <220> |  |    |
| <223> | Primer                                 |    |
| <400> | 1                                      |    |
|       | ttaafcttttg caggcgatgg tggctgttat      | 30 |
| <210> | 2                                      |    |
| <211> | 30                                     |    |
| <212> | DNA                                    |    |
| <213> | Artificial Sequence                    |    |
| <220> |  |    |
| <223> | Primer                                 |    |
| <400> | 2                                      |    |
|       | catacgcatt agtgagtggg ctgtcaggac       | 30 |
| <210> | 3                                      |    |
| <211> | 20                                     |    |
| <212> | DNA                                    |    |
| <213> | Artificial Sequence                    |    |
| <220> |  |    |
| <223> | Primer                                 |    |
| <400> | 3                                      |    |
|       | atgitatctt taccacagtt                  | 20 |

<210> 4  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <400> 4  
 gtcctaataat gaaatacgtgta aaac 24  
 <210> 5  
 <211> 3778  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Inserted DNA with 3' and 5' flanking sequences  
 <400> 5  
 ctcgagcggc cgccagtgtg atggatact gcagaattcg cccttatgtt atctttacca 60  
 cagtttgttg ctctgacaca accggtaaat gcattggcct ttgttttga tggcatcaac 120  
 ttggagcat ctgatttgc atattcagcc tttccatgg taattctttt acaagaattt 180  
 tcattcttc ttaagtataa aacttlagct tgggacaaac ttctgacct atttcttaat 240  
 tttgcaggf gatgggtggct gttatgagca ttttgtgtt gatgtttctt tcttctcatt 300  
 acggtttat tgggatctgg gtggtctctaa ctattacat gagcctccgc gcgtttgctg 360  
 aaggcgggaa aegacaatct gatcccccac aagcttgagc tcaggattta gcagcattcc 420  
 agattgggtt caatcaaaa ggtacgagcc atactcttt atcaaaattg gtatcgccaa 480  
 aaccaagaag gaactcccat cctcaaaagg ttgtaaggaa gaattctcag tccaaagcct 540  
 caacaaggtc aggttacaga gtctcaaac cattagccaa aagctacagg agatcaatga 600  
 agaattctca atcaaaagtaa actactgttc cagcacatgc atcatggica gtaagttca 660  
 gaaaaagaca tccaccgaag acttaaaagt agtgggcate ttgaaagta atcthtgcaa 720  
 catcgagcag ctggcttgcg gggaccagac aaaaaaggaa tgggtgcagaa ttgttaggcg 780  
 cacctacaa aagcatcttt gcctttattg caaagataaa gcagattcct ctagtacaag 840  
 tggggaacaa aataacgtgg aaaagagctg tctgacagc cactcacta atgcgtatga 900  
 cgaacgcagt gacgaccaca aaagaattcc ctctatataa gaaggcattc attcctattt 960  
 gaaggatcat cagatactca accaatccth ctagaagatc taagcttacc gataagcttg 1020  
 atgtaattgg aggaagatca aaatttcaa tccccattct tcatgtctt caattgaagt 1080  
 ttctccgatg gcgcaagta gcagaatctg caatgggtg cagaacccat ctcttatctc 1140  
 caatctctcg aaatccagtc aacgcaaate tcccttatcg gtttctctga agacgcagca 1200

|   |      |
|---|------|
| gcacccacga gcttatecca ttctctcgc gtggggattg aagaagagtg gcatgacgtt  | 1260 |
| aattggctct gagctctgc ctcttaaggt catgtctct, gttccacgg cgtgcatgct   | 1320 |
| tcacgggtgca agcagccgc cagcaactgc tegttaagtc tctggcttt ctggaacct   | 1380 |
| ccgtattcca ggtgacaagt ctatctcca caggiccttc atgtttggag gtctcgctag  | 1440 |
| cggtgaaacc cgtatcaccg gtcttttga aggtgaagat gttatcaaca ctggttaaggc | 1500 |
| tatgcaagct atgggtgcca gaatccgtaa ggaaggtgat acttggatca ttgatggtgt | 1560 |
| tggtaacggg ggactcttg ctctgagge tctctcgtat ttcggtaacg ctgcaactgg   | 1520 |
| ttgccgttg actatgggtc ttgttggtgt ttacgattc gatagcactt tcatgggtga   | 1680 |
| cgcttctct actaagcgc caatgggtcg tgtgtgaac ccactctcgc aatgggtgt     | 1740 |
| gcaggtgaag tctgaagacg gtgactctt tccagttacc ttgcgtggac caaagactcc  | 1800 |
| aacgccaatc acctacaggg tacctatggt tccgctcaa gtgaagtcgc ctgttctgct  | 1860 |
| tgttggtctc aacaccccag gtatcaccac tgttategag ccaatcatga ctctgacca  | 1920 |
| cactgaaaag atgctcaag gttttggtc taaccttacc gttgagactg atgctgacgg   | 1980 |
| tgtgctacc atcctcttg aaggctgtg taagctcacc ggcaagtga ttgatgtcc      | 2040 |
| aggtgatcca tctctactg ctctccatt ggttgcctgc ttgcttctc caggttccga    | 2100 |
| cgtaaccatc cttaacgttt tgatgaacce aacctctact ggtctcatct tgactctgca | 2160 |
| ggaaatgggt gccgacatcg aagtatcaa cccacgtctt gctgggtggag aagacgtggc | 2220 |
| tgacttgcgt gttcgtctt ctactttgaa ggggtgttact gttccagaag acctgctcc  | 2280 |
| ttctatgac gacgagtac caattctgc tgttcagct gcatctctg aaggtgctac      | 2340 |
| cgttatgaac ggtttggaag aactccgtgt haaggaaagc gaccgfcctt ctgctgctc  | 2400 |
| aaacggtctc aagctcaac gtgtgattg cgatgaaggt gagactctc tctctgctc     | 2460 |
| tggtctctc gacgtaaggt gctctgtaa cgcttctgga gcagcbgtc ctaccacct     | 2520 |
| cgatcaccgt atcctatga gctctctgt tatgggtctc gtttctgaaa acctgttac    | 2580 |
| tgttatgat gctactatg tctctactag ctctccagag ttcatggatt tgatggctg    | 2640 |
| tcttgagct aagatcgaac tctccgacac taagctgct tgatgagctc aagaatcga    | 2700 |
| gctcgtacc ggatctcta gctagagctt tcttctgat cctcgttct gacaacgtc      | 2760 |
| gtcaagtca atgcatcagt ttacttgcgc acacaccaga atctctactg gtttgatgt   | 2820 |
| tatggcattg ggaaaactgt tttcttga ccatttgtg tcttctgaa ttactgtgt      | 2880 |
| ttttattcgg tttctctat cgaactgtga aatggaaatg gatggagaag agttaatgaa  | 2940 |
| tgatattggt cttttgtca ttctcaaat aatattattt gtttttctc ttatttgtg     | 3000 |
| tgtgtgaa ttgaaattat aagagatat caaacattt gttttgagta aaaatgtct      | 3060 |
| aaatctggc ctctaatgac cgaagtta atgaggagta aaacactgt agttgtacca     | 3120 |
| ttatcttat tcaataggca acaaatatat ttccagacct agaaaagctg caaatgttac  | 3180 |
| tgaatacaag tatctctct tgtgtttag acatttatga acttctctt atgtaattt     | 3240 |
| ccagaatct tgcagattc taatcattgc ttataatta tagttact catggattg       | 3300 |

|  |      |
|--|------|
| tagttgagta tgaaaatatt ttttaatgca ttttatgact tgccaaltga ttgacaacat  | 3360 |
| gcatcaatcg acclgcagcc actcgaagcg gccgccactc gagtgggtggc cgcacatgat | 3420 |
| gtgaagttc tcaactaagc ccccatftgg acgtgaatgt agacacgtcg aaataaagat   | 3480 |
| ttccgaatta gaataatttg tttattgctt tgcctataa atacgacgga tctgaatttg   | 3540 |
| tctttttatc aaaaatgact ttcatfttat aataacgctg cggacatcta catttttgaa  | 3600 |
| ttgaaaaaaa ttgtaatta ctctttcttt ttctccatat tgaccatcat actcattgfc   | 3560 |
| gatccatgta gatttcccgg acatgaagcc atttacaatt gaatatatcc taagtaaaac  | 3720 |
| ctcataggtt ttacgtattt catttaggga caagggcgaa ttccagcaca ctggcgge    | 3778 |
| <210> 6  |      |
| <211> 3706   |      |
| <212> DNA  |      |
| <213> Artificial Sequence  |      |
| <220>  |      |
| <223> PCR product  |      |
| <400> 6  |      |
| atgttatctt taccacagtt tgttgcctg acaca'acggg taaatgcatt ggcctttgtt  | 60   |
| tttgatggca tcaactttgg agcatctgat ttgcatatt cagccctttc catggttaatt  | 120  |
| ctttacaag aattttcatt ctttcttaag tataaacact tagcttggga caaactctg    | 180  |
| atcctatttc ttaatttttg caggtagatgg tggctgttat gagcattttg tgtttgatgt | 240  |
| ttctttctc tcattacggt ttattggga tctgggtggc tctaactatt tacatgagcc    | 300  |
| tccgcgcgtt tctgaaggc gggaaacgac aatctgatcc ccatcaagct tgagctcagg   | 360  |
| atttagcagc attccagatt gggttcaac aacaaggtag gagccatata actttattca   | 420  |
| aattggtatc gccaaaacca agaaggaact cccatcctca aaggtttgta aggaagaatt  | 480  |
| ctcagtccaa agcctcaaca aggtcagggt acagagctc caaaccatta gccaaaagct   | 540  |
| acaggagatc aatgaagaat ctcaatcaa agtaaaactac tgltcagca catgcatcat   | 600  |
| ggtcagtaag ttccagaaaa agacatccac cgaagactta aagttagtgg gcatctttga  | 660  |
| aagtaatctt gtcaacatcg agcagctggc ttgtggggac cagacaaaaa aggaatggtg  | 720  |
| cagaattggt aggcgcacct accaaaagca tctttgctt tattgcaaag ataaagcaga   | 780  |
| ttcctctagt acaagtgggg aacaaaataa cgtggaaaag agctgtcctg acagcccact  | 840  |
| cactaatgcg tatgacgaac gcagtgacga ccacaaaaga attcctctata tataagaagg | 900  |
| cattcattcc catttgaagg abcatcagat actcaacca tcttctaga agatclaage    | 960  |
| ttatcgataa gcttgatgta attggaggaa gatcaaaatt ttcaatcccc attctctgat  | 1020 |
| tgtttcaatt gaagttctc cgatggcgca agttagcaga atctgcaatg gtgfcgcagaa  | 1080 |
| cccctctctt atctccaate tctcgaaate cagtcaacgc aaatctcctt tateggttcc  | 1140 |
| tctgaagacg cagcagcacc cagagctta tccgatttct tcttctggg gattgaagaa    | 1200 |

|  |      |
|--|------|
| gagtgggatg acgltaatlg gctctgagct fccgctctctt aaggctatgt cttctgtttc | 1260 |
| cacggcglgc atgcttcacg gtgcaagcag ccgfccagca actgctcgtg agtccctctgg | 1320 |
| tctttctgga accgtccgta ttccaggiga caagtctatc tcccacaggi ccttcatgtt  | 1380 |
| tggaggcttc gctagcggtg aaaccctgat caccggctct ttggaagggtg aagatgttat | 1440 |
| caacactggt aaggctatgc aagctatggg tgccagaatc cgtlaaggaag gtgatacttg | 1500 |
| gatcattgat ggtgttggta acgghggact ccttgctctc gaggctctc tcgatttcgg   | 1560 |
| taacgctgca aciggttccc gtttgactat gggctctgtt ggtgtttacg atttcgatag  | 1620 |
| cactttcatt ggtgacgctt ctctactaa gcgtccaatg ggtcgtgtgt tgaaccact    | 1680 |
| tcgcgaaatg ggtgtgcagg tgaagtctga agacgggtgat cgtcttccag ttaccttgcg | 1740 |
| tggaccaaag actccaacgc caatcaccta cagggtacct atggcttccg ctcaagtgaa  | 1800 |
| gtccgctgtt ctgcttctg gctcaaacac cceaggtatc accactgtta tegagccaat   | 1860 |
| catgactcgt gaccacactg aaaagatgct tcaaggtttt ggtgctaacc ttaccgttga  | 1920 |
| gactgatgct gacgggtgtc gtaccatccg tcttgaagggt cgtggtaagc tcaccggtea | 1980 |
| agtgattgat gttccagggt atccatctc tactgcttcc ccallgggtg ctgecttgc    | 2040 |
| tgttccagggt tccgacgta ccatccttaa cgttttgatg aaccaaccc gtactggctt   | 2100 |
| catcttgaact ctgcaggaaa tgggtgccga catcgaagtg atcaaccac gtcttctgg   | 2160 |
| tggagaagac gtagctgact tgcgtgttcg ttcttctact ttgaagggtg ttactgttcc  | 2220 |
| agaagaccgt gctcttctc tgatcgacga gtatccaatt ctctgtgttg cagctgcatt   | 2280 |
| cgttgaagggt gctaccgtta tgaacggttt ggaagaactc cgtgtlaagg aaagcgaccg | 2340 |
| tctttctgct gtcgcaaacg gctcaagct caacgggtgtt gattgcgatg aagggtgagac | 2400 |
| ttctctctc gtgcgtggtc gctctgacgg taagggtctc ggtaacgctt ctggagcagc   | 2460 |
| tgtcgtacc caccctgac accgtatcgc tatgagcttc ctctttatgg gctcgttcc     | 2520 |
| tgaaaacct gttactgttg atgatgctac tatgatcgt actagcttcc cagagttcat    | 2580 |
| ggatttgatg gctggctctg gagctaagat cgaactctcc gacactaagg ctgcttgatg  | 2640 |
| agctcaagaa ttgagctcgc gtaccggatc ctctagctag agctttcgtt cgtatcatcg  | 2700 |
| gtttcgacaa cgttcgtcaa gttcaatgca tcagtttcat tgcgcacaca ccagaatcct  | 2760 |
| actgagtttg agtattatgg calltgggaaa actgttttcc ttgtaccatt tgttctgctt | 2820 |
| gtaatttact gtgttttfa ttcggtttc gctatcgaac tgtgaaatgg aaatggatgg    | 2880 |
| agaagagtta atgaatgata tggctctttt gttcattctc aaattaatat tatttgtttt  | 2940 |
| ttctcttatt tgttgtgtgt tgaatttgaa attataagag atatgcaaac attttgtttt  | 3000 |
| gagtaaaaat gtgtcaaatc gtggcctcta atgaccgaag ttaatgatg gagtaaaaca   | 3060 |
| cttgtagtgg taccattatg cttattcact aggcaacaaa tataatttca gacctagaaa  | 3120 |
| agctgcaaat gttactgaat acaagtatgt cctcttctgt tttagacatt tatgaacttt  | 3180 |
| cttttatgta attttccaga atccttctca gattctaac attgtcttat aattatagtt   | 3240 |
| atactcatgg attttagtll gagtatgaaa atattttta atgcatttfa tgacttgcca   | 3300 |

|   |      |
|---|------|
| atfgattgac aacatgcate aatcgacctg cagccactcg aagcggccgc cactcgagtg | 3360 |
| gtggccgcat cgatcgtgaa gtttctcate taagcccca ttggacgtg aatgtagaca   | 3420 |
| cgtcgaaata aagatttccg aattagaata atttgttat tgetttcgcc tataaatag   | 3480 |
| acggatcgta afcttgcgtt ttatcaaat gtactttcat ttataataa cgfcgceggac  | 3540 |
| atctacafctt ttgaattgaa aaaaattggt aattactctt tcttttctc catattgacc | 3600 |
| atcatactca ttgetgatcc atgtagattt cccggacatg aagccattta caattgaata | 3660 |
| tatcctaagt aaaacctcat aggttttacg tatttcattt agggac                | 3706 |
| <210> 7   |      |
| <211> 23  |      |
| <212> DNA   |      |
| <213> Artificial Sequence   |      |
| <220>   |      |
| <223> Primer  |      |
| <400> 7   |      |
| atgcattggc ctttgtttt gat  | 23   |
| <210> 8   |      |
| <211> 19  |      |
| <212> DNA   |      |
| <213> Artificial Sequence   |      |
| <220>   |      |
| <223> Primer  |      |
| <400> 8   |      |
| tgtcgtttcc cgccttcag  | 19   |
| <210> 9   |      |
| <211> 26  |      |
| <212> DNA   |      |
| <213> Artificial Sequence   |      |
| <220>   |      |
| <223> Primer  |      |
| <400> 9   |      |
| cgctgcggac atctacattt ttgaat                                      | 26   |
| <210> 10  |      |
| <211> 28  |      |
| <212> DNA   |      |
| <213> Artificial Sequence   |      |

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 10

agttaacttt ccacttatcg gggcactg 28

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 288

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR product

&lt;400&gt; 11

atgcattggc cttgttttl gatggcatca actttggagc atctgatlll gcatattcag 60

cctttccat ggtaattctt ttacaagaat ttccattctt tcttaagtat aaacacttag 120

cttgggacaa acttctgac ctatttctta atttttgcag gcgatgggtg ctgltatgag 180

cattttgtgt ttgatgttc tctcttctca ttacggtttt attgggatct ggggtggctct 240

aactatttac atgagcctcc gcgcglttgc tgaaggcggg aaacgaca 288

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 751

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCR product

&lt;400&gt; 12

cgctcgggac atctacattt ttgaattgaa aaaaaattgg taattactct ttcttttct 60

ccatattgac catcatactc attgctgac catgtagatt tcccggacat gaagccattt 120

acaattgaat atactctaag taaaacctca taggtttbac gtatttcatt tagggactaa 180

aatggttlag gataattact tttagctaaca taagataata aataaataaa taaataaaaa 240

taaaatgggt gtagataaat aaggaaatca ataataaata tgagtgtgag tgataggacg 300

ggaatgggaa acttttacac tactttaacg ctattgaacg agtatgagta tgttataaac 360

gtaaaatgtt ttatgtgta gacaatggcc tcaagtgaat gtagaccctat taatggagga 420

aatgcaaac acgagtctga<sup>1</sup> ggtaacgctc gaagaaatga gggcaaggat cgacgcattg 480

cgtagcgacc ctgtttttgg agatgccacg ggagatgcta gtgataaccg aatggattta 540

atgaggttga tgatgatgga gcttttcaa ggaaatcgac aaaggcctag aactgaacaa 600

gaagagtgtct caaacatgct caagaggttt tccgctcata agcccccaac ttatgatgga 660

aagccagacc ccactgagtt tgaagaatgg ctcaacggca tggaaaaatt gttcgalgcc 720

accagtgcc ccgataagtg gaaagttaac t 751

<210> 13

<211> 664

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR product

<400> 13

ftaatititg caggcgatgg tggctggtat gagcattitg tgtttgatgt ttctctcttc 60

tcattacgggt ttattggga tctgggtggc tctaactatt tacatgagcc tccgcgcgtt 120

tgctgaaggc gggaaaagac aatctgatcc ccatcaagct tgagctcagg atttagcagc 180

attccagatt gggttcaatc aacaaggtae gagccatate actttattca aattgggtatc 240

gccaaaacca agaaggaact cccatctca aaggtttga aggaagaatt ctcaagtcca 300

agcctcaaca aggtcagggt acagagtctc caaaccatta gccaaaagct acaggagatc 360

aatgaagaat ctccaatcaa agtaaacac tgttccagca catgcatcat ggtcaglaag 420

tttcagaaaa agacatccac cgaagactta aagttagtgg gcatctttga aagtaatctt 480

gtcaacatcg agcagctggc, ttgtggggac cagacaaaaa aggaatgggtg cagaattggt 540

aggcgcacct accaaaagca tctthgcctt hattgcaaag ataaagcaga ttctctagt 600

acaagtgggg aacaaaataa cgtggaaaag agctgtcctg acagcccact cactaatgcg 660

tatg 664

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 14

gctctgacac aaccggtaaa tgcattggcc 30

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 15

gacccatagt ttgattftaa gcacgacatg 30  
 <210> 16 <211> 29 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <400> 16  
 gcagattctg ctaacttgcg ccatcggag 29  
 <210> 17  
 <211> 1042  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> PCR product  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> PCR product  
 <400> 17  
 gctctgacac aaccggtaaa tgcattggcc ttgtttttg atggcactca ctttggagca 60  
 tctgattttg. catatcagc ctttccatg gtaattctt tacaagaatt ttcatcttt 120  
 ctttaagtata aacacttagc ttgggacaaa ctctgatcc tatttcttaa tttttgcagg 180  
 cgatgggtggc tgttatgagc attttgtgt tgatgtttct ctcttctcat tacggtttta 240  
 ttgggatctg ggtggcctca actatftaca tgagcctccg cgcgtttgct gaaggcggga 300  
 aacgacaalc tgatcccat caagcttgag ctgaggattt agcagcaltc cagattgggt 360  
 tcaatcaaca aggtacgagc catatcactt tattcaaatt ggtatcgcca aaaccaagaa 420  
 ggaactccca tctctaaagg ttgtaagga agaatttca gtcxaaagcc tcaacaaggt 480  
 cagggtacag agtctccaaa ccattagcca aaagctacag gagatcaatg aagaatctt 540  
 aatcaaagta aactactgtt ccagcacatg catcatggtc agtaagtctc agaaaaagac 600  
 atccaccgaa gacttaaagt tagtgggcat ctttgaaagt aatctgtca acatcgagca 660  
 gctggcttgt ggggaccaga caaaaaagga atggtgcaga attgttaggc gcacctacca 720  
 aaagcatctt tgcctttatt gcaaagataa agcagattcc tctagtaaca gtggggaaca 780  
 aaataacgtg gaaaagagct gtctgacag cccactcact aatgcgtatg acgaacgcag 840  
 tgacgaccac aaaagaattc cctctatata agaaggcatt cattccatt tgaaggatca 900  
 tcagatactg aaccaatctt tctagaagat ctaagcttat cgataagctt gatgtahtg 960  
 gaggaagatc aaaattttca atccccatc ttcatfcgct tcaattgaag tttctccgat 1020  
 ggcgcaagtt agcagaatct gc 1042

<210> 18  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <400> 18  
 cggtaaagtc attggccttt gtt 23  
 <210> 19  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <400> 19  
 cacccagatc ccaataaaac cgtaat 26  
 <210> 20  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <400> 20  
 aaatggttgt agataaataa ggaaatca 28  
 <210> 21  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Primer  
 <400> 21  
 acatgtttga gcactcttct tgt

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

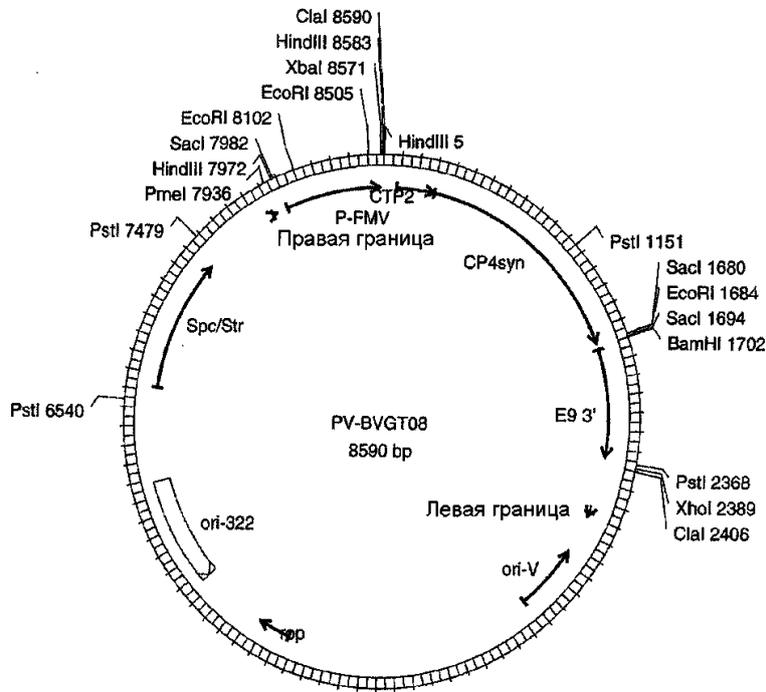
1. Устойчивое к глифосату растение сахарной свеклы, отличающееся тем, что содержит фрагмент ДНК размером от 630 до 700 п.о., предпочтительно 664 п.о., который может быть амплифицирован из



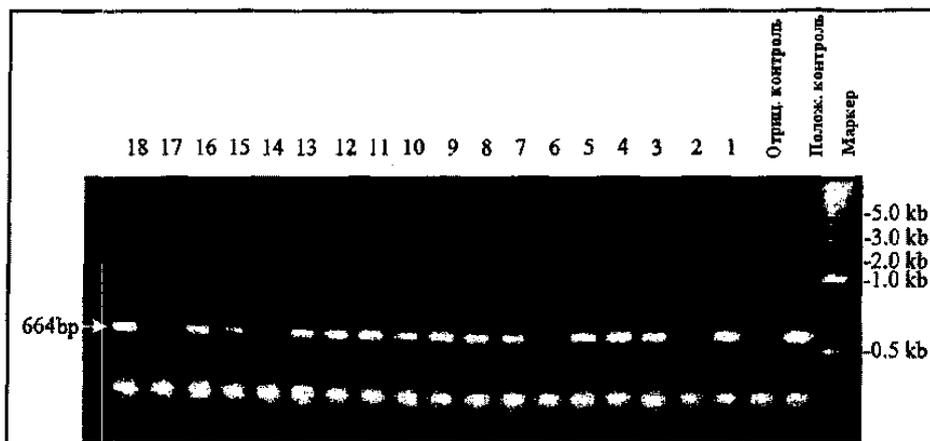
лы, его клеток, ткани или частей, отличающийся тем, что он содержит по крайней мере одну пару праймеров, включающую первый праймер и второй праймер для полимеразной цепной реакции, при этом первый праймер узнает последовательность внутри чужеродной ДНК, инкорпорированной в геном растения, а второй праймер узнает последовательность внутри 3'- или 5'-фланкирующих областей ДНК так, что растение является растением по одному из пп.1-6 или п.9.

12. Тест-набор для идентификации устойчивого к глифосату трансгенного растения сахарной свеклы, его клеток, ткани или частей, содержащий по крайней мере одну пару праймеров, включающую первый праймер и второй праймер для полимеразной цепной реакции, при этом первый праймер узнает последовательность внутри чужеродной ДНК, инкорпорированной в геном растения, а второй праймер узнает последовательность внутри 3'- или 5'-фланкирующих областей ДНК, отличающийся тем, что первый праймер имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, а второй праймер имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, и/или первый праймер имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, а второй праймер имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8, и/или первый праймер имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9, а второй праймер имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 10, и/или первый праймер имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14, а второй праймер имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16.

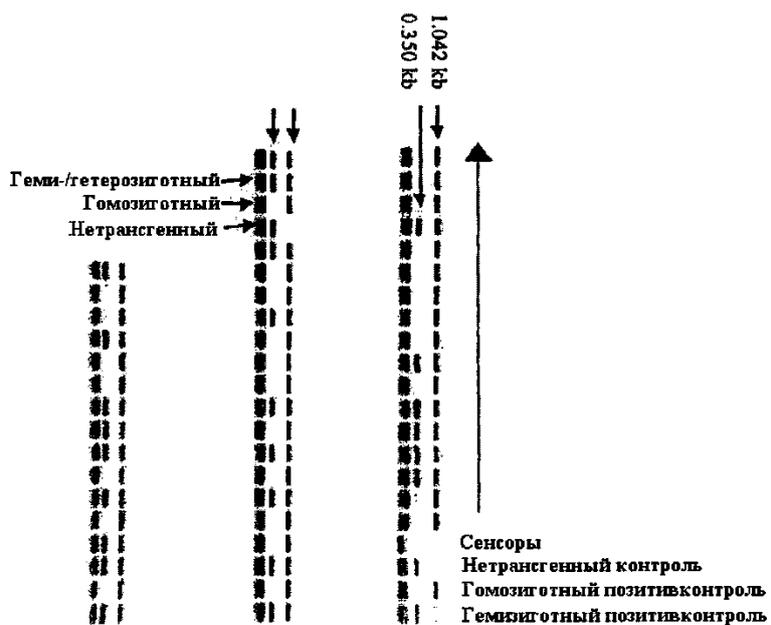
13. Тест-набор по п.11 или 12, отличающийся тем, что первый праймер и второй праймер узнают нуклеотидную последовательность, которая является частью нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5.



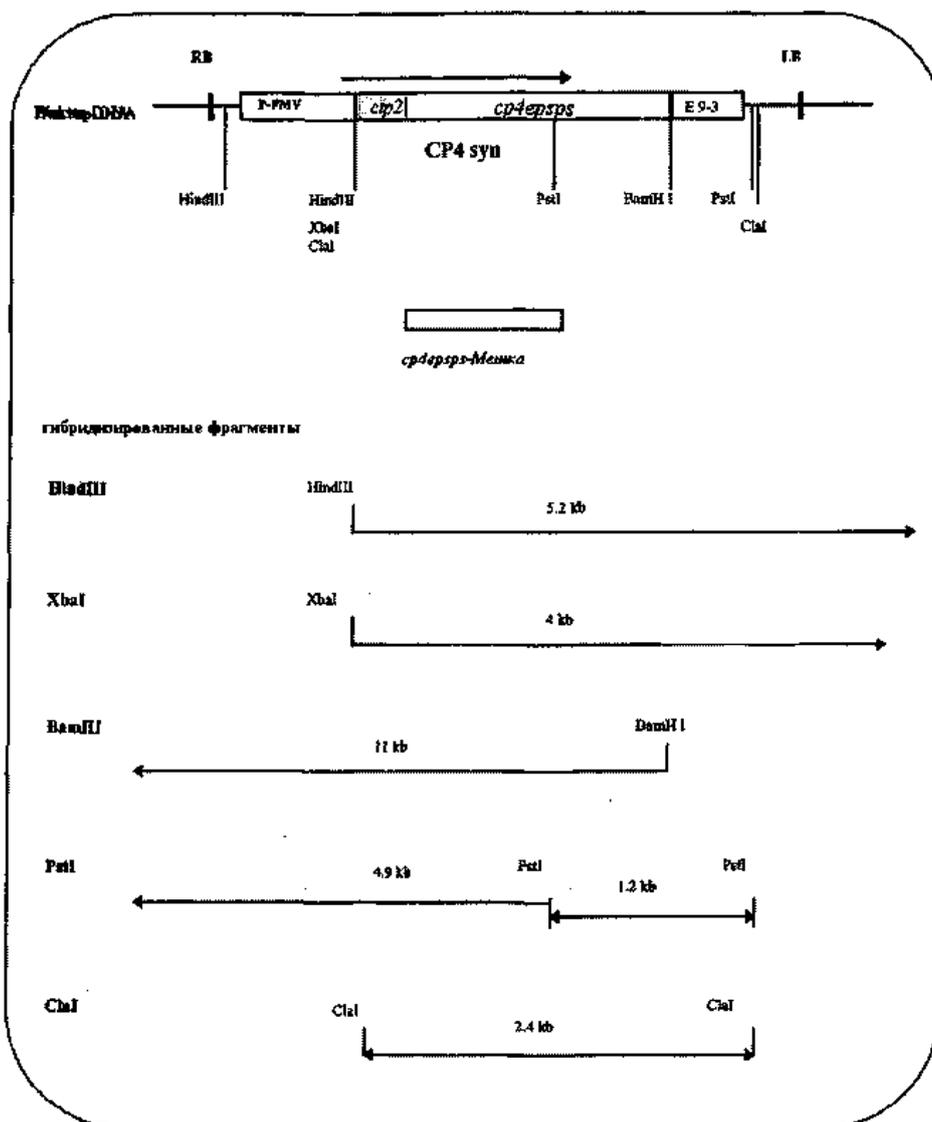
Фиг. 1



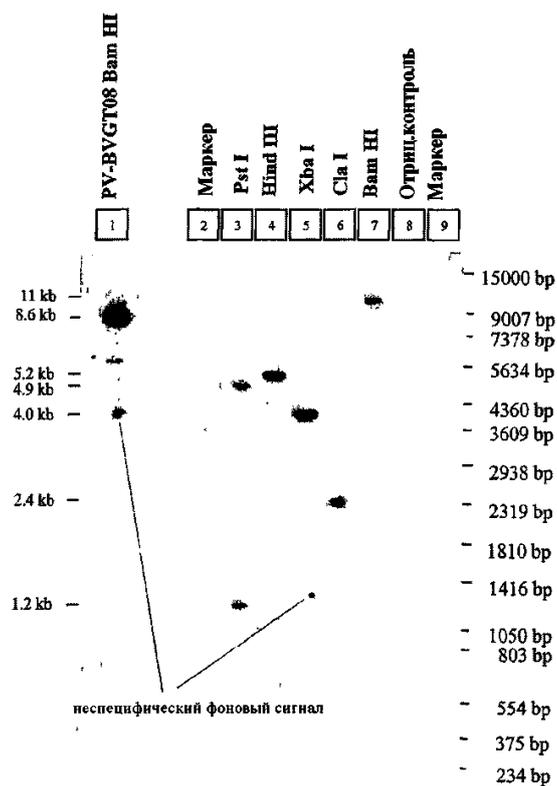
Фиг. 2



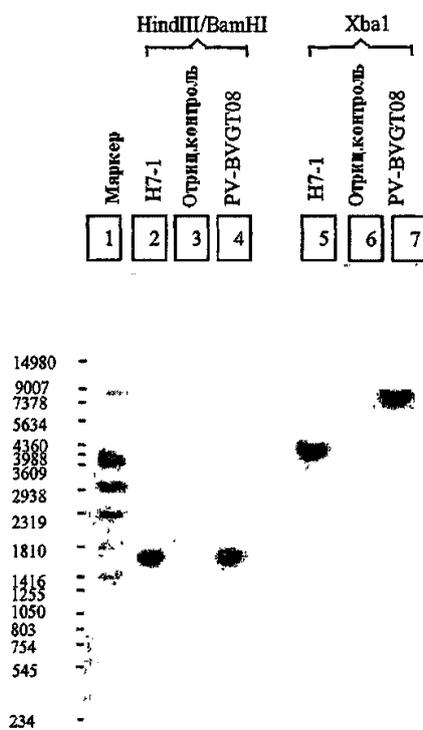
Фиг. 3



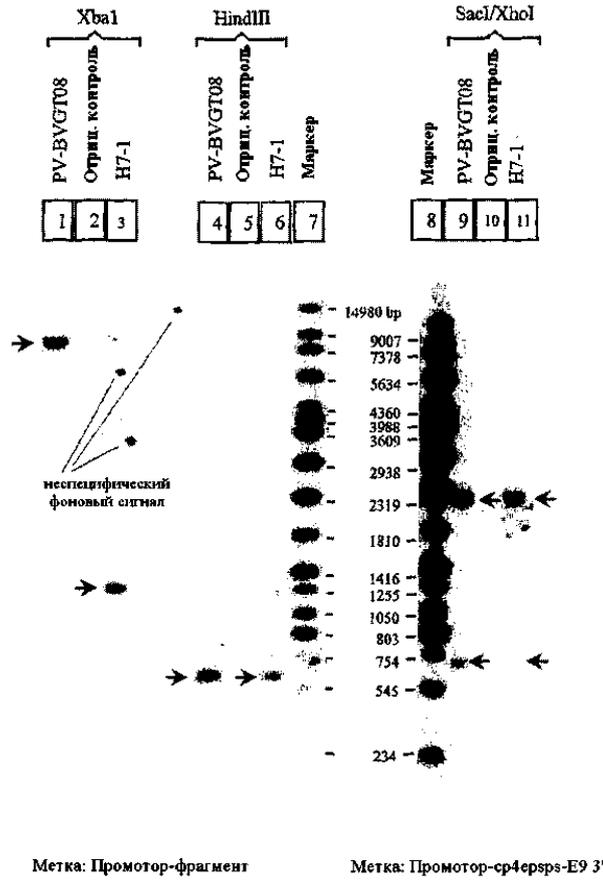
Фиг. 4



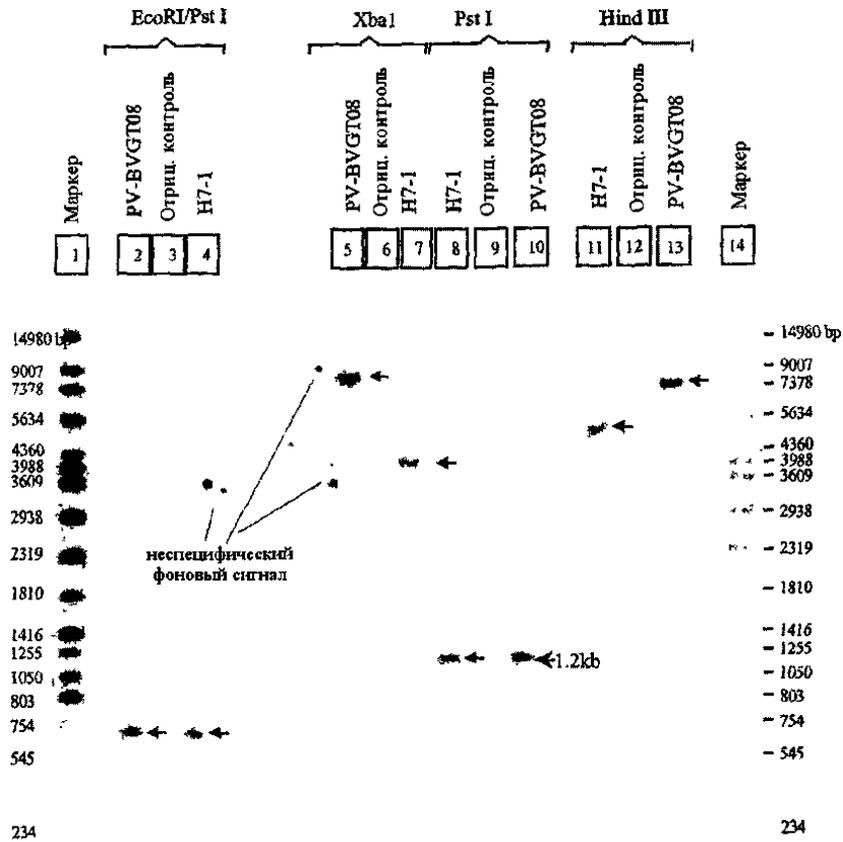
Фиг. 5



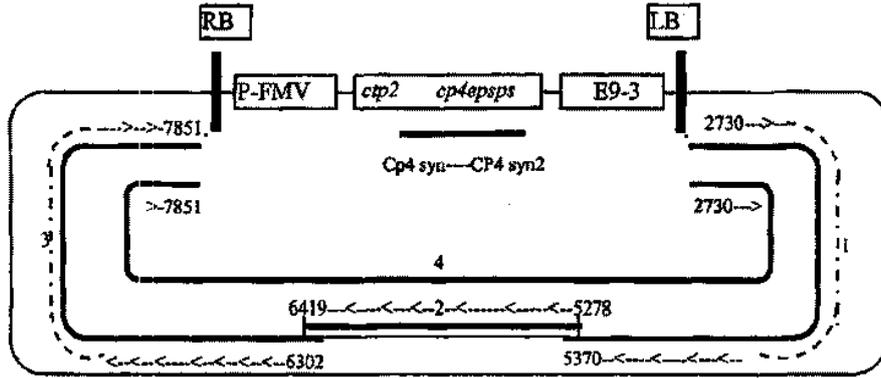
Фиг. 6



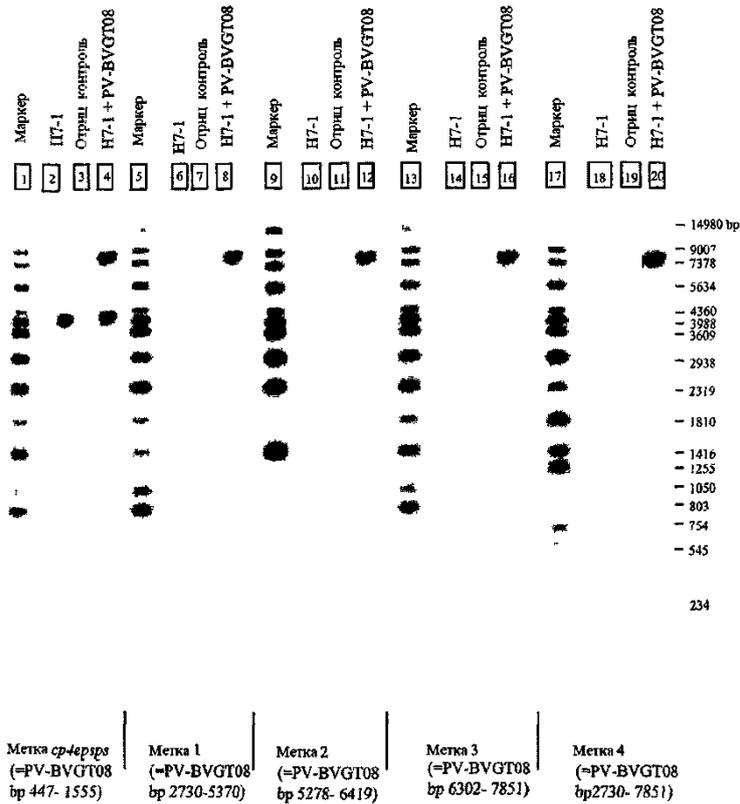
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

```

GAAATAAAGG TTCCGAATT AGAATAATTT GTTATTGCT TTCGCCATA AATACGACGG 140
GAAATAAAGG TTCCGAATT AGAATAATTT GTTATTGCT TTCGCCATA AATACGACGG 2520

ATCGTAATTT GTCGTTTAT CAAATGATC TTTCATTTA TAATAACGCT GCGGACATCT 200
ATCGTAATTT GTCGTTTAT CAAATGATC TTTCATTTA TAATAACGCT GCGGACATCT 2580

ACATTTTGA ATTGAAAAA AATTGGTAA TACTCITTC TTTTCGCCA ATTGACCATC 260
ACATTTTGA ATTGAAAAA AATTGGTAA TACTCITTC TTTTCGCCA ATTGACCATC 2640

ATACTCATTC CTGATCCATG TAGATTTCCC GCACATGAG CCAATTCACA TCGAATATAT 320
ATACTCATTC CTGATCCATG TAGATTTCCC GCACATGAG CCATTACAAATTCATATAT 2700

CCTAAGTAAA ACCCATAGG TTTACGTTT TFCATTTAGG GACTAAATG GTTTAGATA 380
CCATTCGCCC CTGCCGCTT GCACCCGTC GAGCTTCAT GTTGGTTCT ACCCAGAAT 2760
    
```

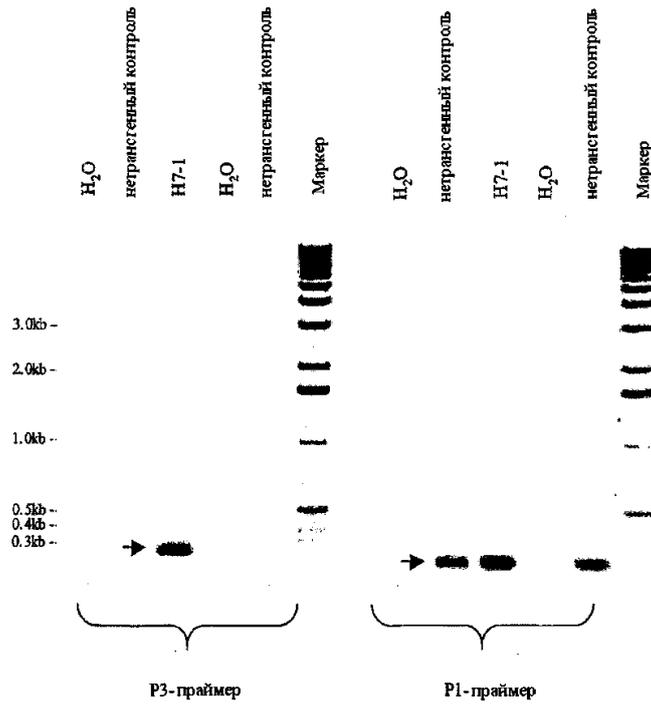


genomische DNA

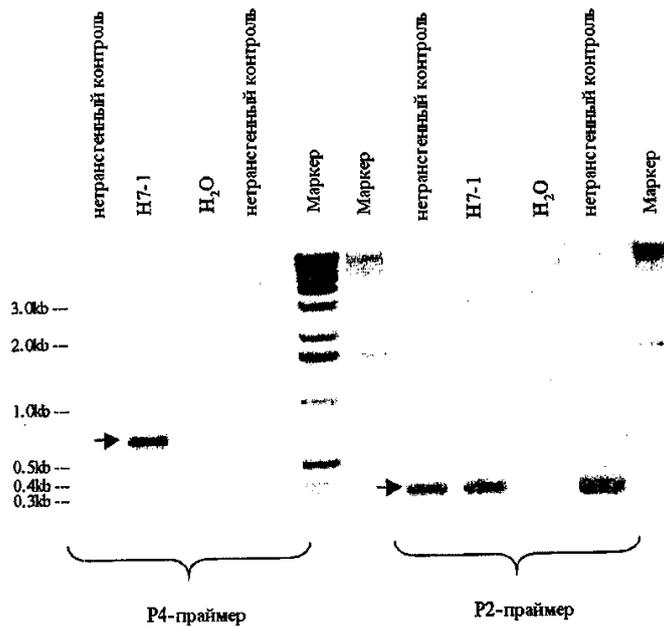
Фиг. 11



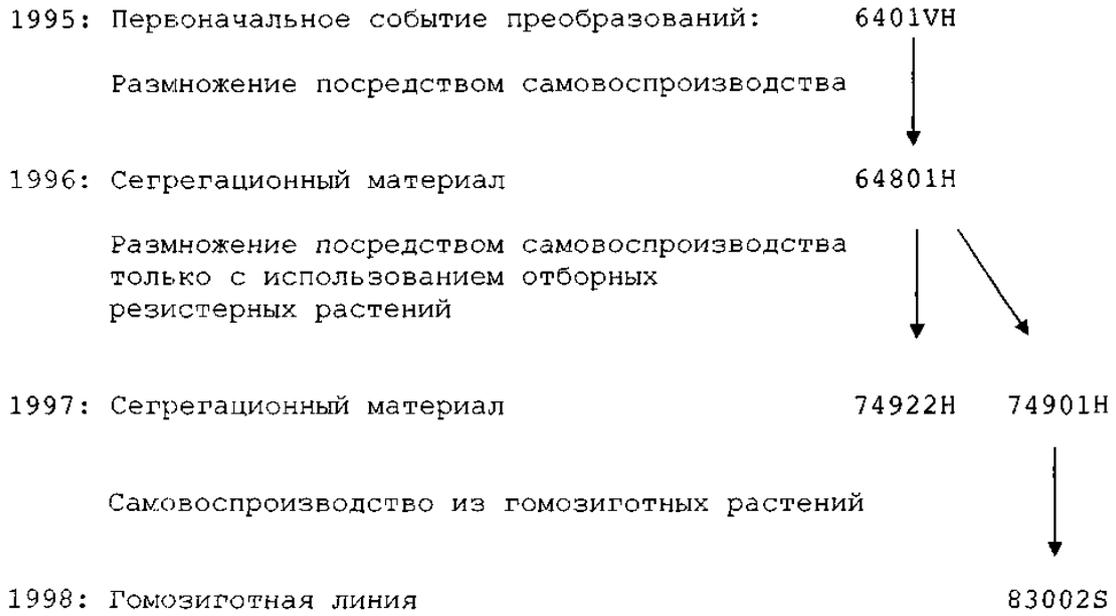
Фиг. 12



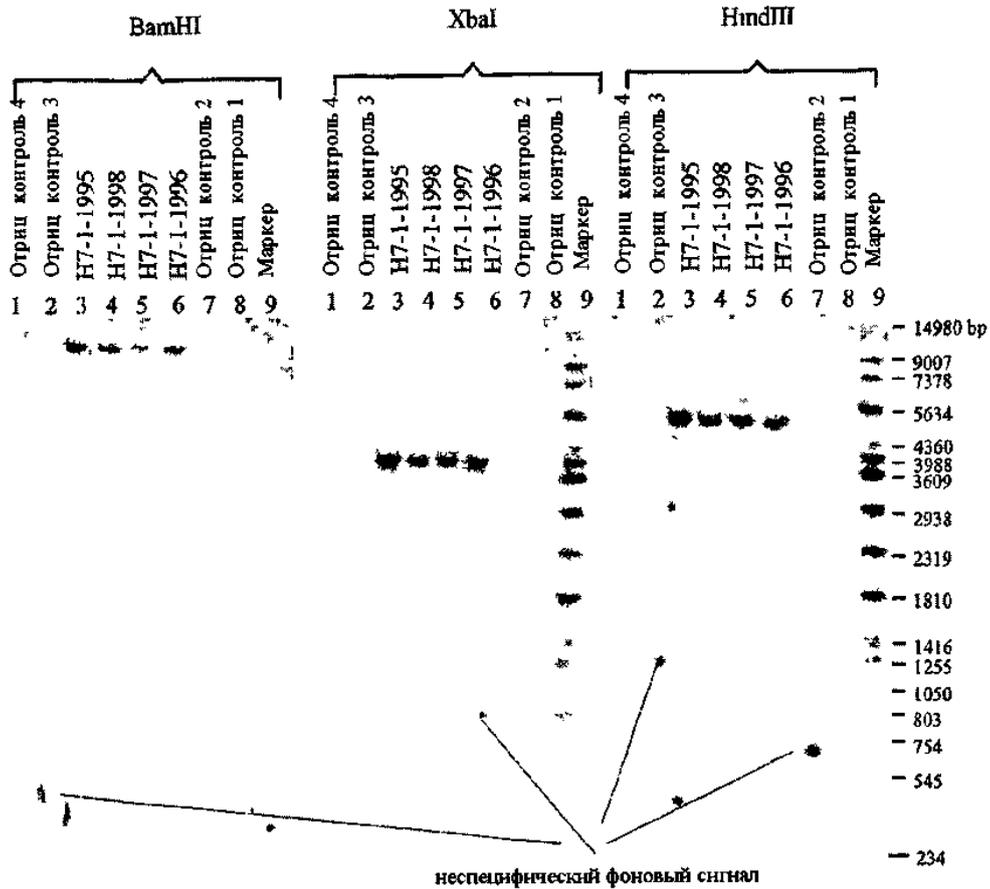
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16

