

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038896**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.03

(21) Номер заявки
201792036

(22) Дата подачи заявки
2016.03.14

(51) Int. Cl. **C12N 15/01** (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
A01H 1/06 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ САЙТ-НАПРАВЛЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ГЕНОМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕНАСЛЕДУЕМЫХ МАТЕРИАЛОВ**

(31) **201510114017.4**

(32) **2015.03.16**

(33) **CN**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/CN2016/076244**

(87) **WO 2016/155482 2016.10.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ
И БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ
АКАДЕМИИ НАУК КИТАЯ (CN)**

(72) Изобретатель:
**Гао Каиксиа, Лианг Жен, Ванг
Янпэнг, Шан Киуей, Сонг Кианна
(CN)**

(74) Представитель:
**Вашук Т.В., Емельянова В.А.,
Королева С.В. (BY)**

(56) **CN-A-103382468
CN-A-103667338
CN-A-103343120
CN-A-103898099
CN-A-104212778
CN-A-103952405**

CN-A-104293828

CN-A-102812034

CURTIN, S.C. et al., "Targeted Mutagenesis of Duplicated Genes in Soybean with Zinc Finger Nucleases", *PLANT PHYSIOLOGY*, vol. 156, no. 2, 30 June 2011 (30.06.2011), ISSN: 0032-0889, pages 466-473, see abstract, page 469

LIANG, Zhen et al., "Targeted Mutagenesis in Zea Mays Using TALENs and the CRISPR/Cas System", *JOURNAL OF GENETICS AND GENOMICS*, 14 November 2013, vol. 41, no. 2, ISSN: 1673-8527, pages 63-68, see abstract, and result and discussion

FANG, Rui et al., "New Method of Genome Editing Derived from CRISPR/Cas9", *PROGRESS IN BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*, vol. 40, no. 8, 31 August 2013 (31.08.2013), ISSN: 1000-3282, pages 691-702, see the whole document

ZHANG, Jinmai et al., "TALENs: A New Genome Site-Specific Modification Technology", *CHINESE BULLETIN OF LIFE SCIENCES*, vol. 25, no. 1, 31 January 2013 (31.01.2013), ISSN: 1004-0374, pages 126-132, see the whole document

XIAO, An et al., "Progress in Zinc Finger Nuclease Engineering for Targeted Genome Modification", *HEREDITAS*, vol. 33, no. 7, 31 July 2011 (31.07.2011), ISSN: 0253-9772, pages 665-683, see the whole document

(57) В изобретении раскрывается способ осуществления сайт-направленной модификации растительного генома с использованием ненаследуемых материалов. Способ по данному изобретению включает, в частности, следующие этапы: введение ненаследуемого материала в клетку или ткань либо часть растения интереса, при этом ненаследуемый материал представляет собой нуклеазу, специфичную в отношении целевого фрагмента, либо мРНК, экспрессирующую нуклеазу, целевой фрагмент расщепляется нуклеазой, и сайт-направленная модификация целевого фрагмента достигается путем репарации ДНК растения. Путем введения ненаследуемого материала последовательность-специфической нуклеазы может быть достигнута сайт-направленная мутация гена растения, при этом получаемое растение не будет содержать внедренные экзогенные гены или фрагменты нуклеиновой кислоты. Таким образом, настоящее изобретение может способствовать более точному исследованию функций генома и повышению биобезопасности в селекционной деятельности.

B1**038896****038896****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к области генетической инженерии растений и касается способа осуществления сайт-направленной модификации растительных геномов с использованием ненаследуемых материалов, в частности нетрансгенного метода осуществления сайт-направленной модификации растительного генома с использованием белка или мРНК.

Предпосылки создания изобретения

Технология редактирования генома является наиболее обещающим инструментом для исследования функции генов и генетического улучшения культурных растений. Технологии редактирования генома, которые используются в настоящее время, включают нуклеазы цинковые пальцы (ZFN), эффектор-ные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN) и короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированные системы (CRISPR/Cas9), которые называются последовательность-специфическими нуклеазами (SSN). Их общим признаком является то, что они могут действовать в качестве эндонуклеазы для расщепления специфических последовательностей ДНК с образованием в ДНК двухцепочечных разрывов (DSB). DSB способны активировать внутренний механизм репарации клеток - негомологичное соединение концов (NHEJ) и гомологичную рекомбинацию (HR) - для репарации повреждений ДНК. Сайт-направленная замена или инсерция может обеспечивать получение мутантов. В настоящее время технологии редактирования геномов эффективно используются в отношении некоторых растений (например, риса, *Arabidopsis*, кукурузы, пшеницы) для модификации растительных геномов и демонстрируют значительный потенциал в плане улучшения агрономических признаков важнейших сельскохозяйственных культур.

Тем не менее, несмотря на то, что редактирование геномов подает большие надежды на улучшение сельскохозяйственных культур, с его применением связаны и большие вызовы. Для осуществления редактирования генома необходимо, чтобы последовательность-специфическая нуклеаза экспрессировалась в клетке. В настоящее время метод экспрессии последовательность-специфической нуклеазы в растительных клетках заключается в доставке экспрессионного вектора или фрагмента ДНК, экспрессирующего нуклеазу, в клетки посредством стандартных методов трансформации (*Agrobacterium*-опосредованной трансформации, бомбардировки частицами, микроинъекций и т.п.). Такие наследуемые материалы случайно интегрируются в растительную хромосому и транскрибируются для осуществления редактирования. Указанные стандартные подходы к трансформации связаны с внедрением экзогенных генов в растительный геном и требуют присутствия селективных маркеров (селективное давление) в процессе трансформации, что может приводить к нежелательным фенотипам. Использование получаемых в результате растений подпадает под регулирование ГМО. Таким образом, существует необходимость в разработке метода осуществления редактирования генома растений без введения наследуемого материала ДНК.

Краткое изложение сущности изобретения

Целью изобретения является обеспечение способа осуществления сайт-направленной модификации целевого фрагмента гена-мишени растения.

Способ осуществления сайт-направленной модификации целевого фрагмента гена-мишени растения по данному изобретению, в частности, включает следующие этапы: введение ненаследуемого материала в клетку или ткань либо часть растения интереса; при этом ненаследуемый материал представляет собой нуклеазу, специфичную в отношении целевого фрагмента, или мРНК, экспрессирующую нуклеазу, целевой фрагмент расщепляется нуклеазой, и сайт-направленная модификация целевого фрагмента достигается путем репарации ДНК растения.

В способе по настоящему изобретению ненаследуемый материал вводится в клетку или ткань либо часть растения интереса. Ненаследуемый материал может экспрессировать нуклеазу для осуществления сайт-направленной модификации целевого фрагмента либо ненаследуемый материал может направлять на целевой фрагмент действие нуклеазы и приводить к сайт-направленной модификации. В процессе модификации или после нее ненаследуемый материал может деградировать вследствие метаболизма в клетке. Модифицированная клетка или ткань могут быть регенерированы в интактное растение путем использования традиционного метода культуры ткани. В результате получают нетрансгенное растение, в котором модифицирован только целевой фрагмент и отсутствует введенный экзогенный наследуемый материал.

В способе по настоящему изобретению нуклеаза представляет собой нуклеазу TALEN, нуклеазу цинковые пальцы, нуклеазу CRISPR/Cas9 либо любую другую нуклеазу, с помощью которой может достигаться редактирование генома.

Соответственно выбираемый ненаследуемый материал может представлять собой любой из следующих (а)-(с):

(а) ненаследуемый материал представляет собой нуклеазу TALEN или мРНК, способную экспрессировать спаренные белки TALEN; при этом белок TALEN состоит из ДНК-связывающего домена, способного узнавать целевой фрагмент и связываться с ним, и домена Fok I.

В варианте осуществления изобретения (пример 1) ненаследуемый материал включает мРНК, содержащие последовательности SEQ ID NO: 3 и 4. В еще одном варианте осуществления изобретения

(пример 2) ненаследуемый материал включает белки SEQ ID NO: 7 и 8;

(b) ненаследуемый материал представляет собой нуклеазу цинковые пальцы или mPНК, способную экспрессировать спаренные белки ZFN; при этом белок ZFN состоит из ДНК-связывающего домена, способного узнавать целевой фрагмент и связываться с ним, и домена Fok I.

(c) ненаследуемый материал включает белок Cas9 или mPНК, способную экспрессировать белок Cas9, а также направляющую РНК; при этом направляющая РНК представляет собой РНК палиндромной структуры, образующуюся путем частичного спаривания оснований между crPНК и tracrPНК; crPНК содержит фрагмент РНК, способный комплементарно связываться с целевым фрагментом.

В варианте осуществления изобретения (пример 3) ненаследуемый материал включает белок, как показано в SEQ ID NO: 10, и sgPНК, как показано в SEQ ID NO: 11. В еще одном варианте осуществления изобретения (пример 4) ненаследуемый материал включает белок, как показано в SEQ ID NO: 10, и sgPНК, как показано в SEQ ID NO: 12.

В способе по настоящему изобретению клетка может представлять собой любую клетку, в которую может быть введен ненаследуемый материал и которая может быть регенерирована в интактное растение посредством культуры ткани. Ткань может представлять собой любую ткань, в которую может быть введен ненаследуемый материал и которая может быть регенерирована в интактное растение посредством культуры ткани. Часть растения представляет собой часть интактного растения (не ex vivo часть), в которую может быть введен ненаследуемый материал.

В частности, клетка может представлять собой протопласт клетки или суспензию клетки. Ткань может представлять собой каллус, незрелый зародыш либо зрелый зародыш. Часть может представлять собой лист, вершину побега, гипокотиль, молодое соцветие или пыльцевую трубку.

В способе по настоящему изобретению подходами, применяемыми для введения ненаследуемого материала в клетку или ткань либо часть растения интереса, могут быть бомбардировка частицами, PEG-опосредованная трансформация протопласта, трансформация с использованием прорастающих пыльцевых трубок, а также любые другие подходы введения ненаследуемого материала.

В способе по настоящему изобретению сайт-специфическая модификация представляет собой инсерцию, делецию и/или замену нуклеотида в целевом фрагменте.

Еще одной целью изобретения является способ получения нетрансгенного мутантного растения.

Способ получения нетрансгенного мутантного растения по данному изобретению может, в частности, включать следующие этапы: осуществление сайт-направленной модификации целевого фрагмента гена-мишени растения интереса и получение, таким образом, растения, в котором функции гена-мишени утрачены или изменены и геном которого свободен от внедренного экзогенного гена.

Согласно настоящему изобретению растение может быть однодольным или двудольным растением. В некоторых вариантах осуществления изобретения таким растением является рис, кукуруза, пшеница или табак.

В отличие от наследуемого материала ДНК белок и mPНК представляют собой два вида ненаследуемых материалов, которые могут легко деградировать в клетке при помощи механизма защиты. Посредством транзientного введения mPНК или белка последовательность-специфической нуклеазы могут быть получены мутанты с нокаутом генов без внедрения гена последовательность-специфической нуклеазы или фрагмента вектора в геном плоскостного расположения, в частности, свободные от трансгена. Способ по данному изобретению позволяет достичь более высокой биобезопасности. Сорты культурных растений, полученные в соответствии с данным способом, не подлежат регулированию как содержащие ГМО. Настоящее изобретение имеет исключительно большое значение для фундаментальных исследований и для селекции сельскохозяйственных культур.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано получение мутаций гена TaGW2 путем трансформации незрелого зародыша пшеницы с использованием mPНК Cas9 и sgPНК. А: гелеэлектрофореграмма Cas9-mPНК, *in vitro* транскрибированной с помощью набора для транскрипции mPНК (AM1344, Ambion). В: результаты ПЦР-RE, показывающие мутации в целевом участке TaGW2 у растений T0, полученные при помощи mPНК Cas9 и sgPНК-GW2-C14. С: результаты секвенирования, указывающие на то, что *in vitro* транскрибированная mPНК Cas9 и sgPНК-GW2-C14 индуцировали мутации в целевом участке. WT означает последовательность гена дикого типа, "-" означает последовательность с делецией, "+" означает последовательность с инсерцией, "-/+" означает количество делетированных или инвертированных нуклеотидов.

На фиг. 2 показано получение мутаций гена OsBADH2 путем транзientной трансформации протопластов риса с использованием mPНК-TALEN. А: гелеэлектрофореграмма, показывающая *in vitro* транскрипцию T-BADH2b-L и T-BADH2b-R с помощью набора для транскрипции mPНК (AM1344, Ambion), и что к 3'-концу mPНК добавлен PolyA-хвост. В: результаты ПЦР-RE, показывающие мутации в целевом участке, полученные при помощи *in vitro* транскрибированной mPНК в протопластах. С: результаты секвенирования, указывающие на то, что *in vitro* транскрибированная mPНК индуцировала мутации в целевом участке. WT означает последовательность гена дикого типа, "-" означает последовательность с делецией, "+" означает последовательность с инсерцией, "-/+" означает количество делетированных или инвертированных нуклеотидов.

На фиг. 3 показан мутагенез гена MLO пшеницы путем трансформации протопластов пшеницы с использованием белков MLO-TALEN. А: результаты SDS-PAGE, показывающие прокариотическую экспрессию и очистку T-MLO-L и T-MLO-R в отношении целевого участка MLO. В: результаты ПЦР-РЕ, показывающие мутации в целевом участке, полученные при помощи белков TALEN в протопластах. С: результаты секвенирования, указывающие на то, что полученные *in vitro* белки TALEN индуцировали мутации в целевом участке. WT означает последовательность гена дикого типа, "-" означает последовательность с делецией, "+" означает последовательность с инсерцией, "-/+" означает количество делетированных или инсертированных нуклеотидов.

На фиг. 4 показан мутагенез гена TaGASR7 пшеницы путем трансформации протопластов пшеницы с использованием белка Cas9 и *in vitro* транскрибированной sgPHK. А: результаты SDS-PAGE, показывающие прокариотическую экспрессию и очистку белка Cas9. В: результаты ПЦР-РЕ, показывающие мутации в целевом участке, полученные при помощи белка Cas9 и *in vitro* транскрибированной sgPHK. С: результаты секвенирования, указывающие на то, что полученный *in vitro* белок Cas9 и *in vitro* транскрибированная sgPHK индуцировали мутации в целевом участке. WT означает последовательность гена дикого типа, "-" означает последовательность с делецией, "+" означает последовательность с инсерцией, "-/+" означает количество делетированных или инсертированных нуклеотидов.

На фиг. 5 показано получение мутаций гена NtPVY путем котрансформации белком Cas9 и *in vitro* транскрибированной sgPHK в протопластах табака, а также получение мутантных растений путем регенерации. А: результаты ПЦР-РЕ протопластов, показывающие мутации в целевом участке, полученные при помощи белка Cas9 и *in vitro* транскрибированной sgPHK. В: результаты секвенирования, указывающие на то, что котрансформация полученным *in vitro* белком Cas9 и *in vitro* транскрибированной sgPHK в протопластах табака индуцировала мутации в целевом участке. С: детекция мутантных растений, регенерированных из протопластов, и результаты секвенирования целевых участков. WT означает последовательность гена дикого типа, "-" означает последовательность с делецией, "+" означает последовательность с инсерцией, "-/+" означает количество делетированных или инсертированных нуклеотидов.

Подробное описание вариантов осуществления изобретения

Все экспериментальные способы, использованные в следующих примерах, представляют собой традиционные способы, если не указано иное.

Все материалы и реагенты, использованные в следующих примерах, получены из коммерческих источников, если не указано иное.

Сорт пшеницы Bobwhite раскрыт в "Weeks, J.T. и соавт. Быстрое производство множества независимых линий фертильной трансгенной пшеницы. *Plant Physiol.* 102: 1077-1084, (1993)" и может быть получен в Институте генетики и биологии развития Китайской академии наук.

Вектор T-MLO для таргетирования гена TaMLO пшеницы с помощью TALENs раскрыт в "Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C. и Qiu, J.L. (2014). Совместное редактирование трех гомеоаллелей в гексаплоидной мягкой пшенице придает наследуемую устойчивость к мучнистой росе. *Nature Biotechnology.* 32, 947-951" и может быть получен в Институте генетики и биологии развития Китайской академии наук.

Прокариотический экспрессионный вектор pGEX-4T получен от Shanghai BeiNuo Biotechnology Co. Ltd., Cat. No. 1110024.

Вектор pXT7-Cas9, *in vitro* транскрибированной Cas9-mPHK, раскрыт в "Chang N., Sun C., Gao L., Zhu D., Xu X. и соавт., 2013. Редактирование генома РНК-направляемой нуклеазой Cas9 в эмбрионах данио-рерио. *Cell research* 23:465-72" и может быть получен у авторов.

Вектор pT7-gRNA раскрыт в "Программируемая двухкомпонентная РНК-направляемая ДНК-эндонуклеаза в адаптивной иммунной системе бактерий. *Science* 337(6096):816-821" и может быть получен в Институте генетики и биологии развития Китайской академии наук.

Кукуруза сорта HiII раскрыта в "Armstrong, C.L., Green, C.E. & Phillips, R.L. Создание и доступность идиоплазмы с высоким уровнем формирования культур класса II. *Maize Genet. Coop. News Lett.* 65,92-93 (1991)" и может быть получена в Институте генетики и биологии развития Китайской академии наук.

Растворы, использованные для приготовления и трансформации протопласта риса, представлены в табл. 1-5.

Таблица 1

50-мл раствор для энзимолита

	Добавляемое количество	Окончательная концентрация
Целлюлоза R10	0,75 г	1,5%
Мацерозим R10	0,375 г	0,75%
Маннитол	5,4651 г	0,6 М
2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота	0,1066 г	10 мМ
доводили раствор водой двойной дистилляции до 50 мл, pH регулировали до 5,7 с помощью KOH; инкубировали на водяной бане при 55°C в течение 10 мин и охлаждали при комнатной температуре перед добавлением		
CaCl ₂	0,0735 г	10 мМ
BSA	0,05 г	0,1%
фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм		

Таблица 2

500-мл W5

	Добавляемое количество	Окончательная концентрация
NaCl	4,5 г	154 мМ
CaCl ₂	9,189 г	125 мМ
KCl	0,1864 г	5 мМ
2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота	0,2132 г	2 мМ
доводили раствор водой двойной дистилляции до 500 мл, pH регулировали до 5,7 с помощью NaOH		

Таблица 3

10-мл раствор MMG

	Добавляемое количество	Окончательная концентрация
Маннитол (0,8 М)	5 мл	0,4 М
MgCl ₂ (1 М)	0,15 мл	15 мМ
2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота	0,2 мл	4 мМ
Вода двойной дистилляции	Доводили до 10 мл	

Таблица 4

4-мл раствор PEG

	Добавляемое количество	Окончательная концентрация
PEG4000	1,6 г	40%
Маннитол (0,8 М)	1 мл	0,2 М
CaCl ₂ (1 М)	0,4 мл	0,1 М
Вода двойной дистилляции	Доводили до 4 мл	

Таблица 5

250-мл раствор WI

	Добавляемое количество	Окончательная концентрация
Маннитол	27,324 г	0,6 М
KCl	0,0745 г	4 мМ
2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (200 мМ)	0,2135 г	4 мМ
доводили раствор водой двойной дистилляции до 250 мл, pH регулировали до 5,7 с помощью KOH		

В табл. 1-5 выше % раствора означает количество единиц массы в единице объема, т.е. выражение "1% раствор" означает, что в 100 мл жидкости находится 1 г вещества.

Среды, применяемые для культивирования ткани пшеницы, включают гипертонический раствор: минимальная среда MS с добавлением 90 г/л маннитола, 5 мг/л 2,4-D, 30 г/л сахарозы и 3 г/л фитогеля, pH 5,8;

индукционную среду: минимальная среда MS с добавлением 2 мг/л 2,4-D, 0,6 мг/л сульфата меди, 0,5 мг/л казеиновых гидролизатов, 30 г/л сахарозы и 3 г/л фитогеля, pH 5,8;

среду для дифференциации: минимальная среда MS с добавлением 0,2 мг/л кинетина, 30 г/л сахарозы и 3 г/л фитогеля, pH 5,8;

среду для корнеобразования: 1/2 минимальной среды MS с добавлением 0,5 мг/л метансульфоновой кислоты, 0,5 мг/л α -нафтилуксусной кислоты, 30 г/л сахарозы и 3 г/л фитогеля, pH 5,8.

Пример 1. Сайт-направленное редактирование TaGW2 путем трансформации незрелого зародыша пшеницы при помощи *in vitro* транскрибированной mPНК Cas9 и sgPНК.

I. Дизайн целевого фрагмента: мишень-C14.

Мишень-C14: 5'-CCAGGATGGGGTATTTCTAGAGG-3' (в консервативной области экзона 8 гена TaGW2 пшеницы, группы А, В и D).

II. In vitro транскрипция и очистка Cas9-mPHK.

1. Вектор pXT7-Cas9 переваривали при помощи XbaI. Переваренный продукт очищали с использованием набора для очистки (Axygen) до концентрации, превышающей 100 нг/мкл, и обозначали как pXT7-Cas9-XbaI.

2. Очищенный продукт pXT7-Cas9-XbaI транскрибировали с применением набора для in vitro транскрипции (AM1344, Ambion). Продукт очищали с использованием набора для очистки mPHK (AM1908, Ambion) до концентрации, превышающей 500 нг/мкл. Электрофореграмма в агарозном геле in vitro транскрибированной Cas9-mPHK показана на фиг. 1А.

III. In vitro транскрипция sgPHK против целевого участка.

1. Целевой участок TaGW2 встраивали в вектор pTaU6-gRNA.

Были синтезированы следующие одноцепочечные олигонуклеотиды с липкими концами (подчеркнуты):

C14F: 5'-CTTGCAGGATGGGGTATTTCTAG-3';

C14R: 5'-AAACCTAGAAATACCCCATCCTG-3'.

Образовали двухцепочечную ДНК с липкими концами посредством расщепления C14F и C14R и инсертировали между двумя сайтами рестрикции BbsI плазмиды pTaU6-gRNA, в результате получали плазмиду pTaU6-gRNA, содержащую сайт C14. Позитивный контроль плазмиды выполняли путем секвенирования. Рекомбинантная плазида, полученная инсертированием фрагмента ДНК, как показано в 5'-CTTGCAGGATGGGGTATTTCTAG-3' в прямом направлении в сайт рестрикции BbsI плазмиды pTaU6-gRNA, была позитивной и была обозначена как pTaU6-gRNA-C14.

2. In vitro амплификация и очистка фрагмента ДНК T7-TaGW2-gRNA.

Дизайн праймера.

T7-GW2-F: TAATACGACTCACTATAGGCAGGATGGGGTATTTCTAG;

gRNA-PCR-R: AGCACCGACTCGGTGCCACTT.

ПЦР-амплификацию проводили с использованием pTaU6-gRNA-C14 в качестве матрицы. Продукт ПЦР очищали с использованием набора для очистки продуктов ПЦР (AP-GX-250G, Axygen) до концентрации, превышающей 100 нг/мкл. Получаемый в результате продукт ПЦР представлял собой sgPHK, содержащую промотор T7 и целевой участок TaGW2, и был обозначен как T7-TaGW2-gRNA.

3. In vitro транскрипция sgPHK, содержащей целевой участок TaGW2 sgRNA-GW2-C14 (как показано в SEQ ID NO: 17) in vitro транскрибировали с использованием набора для in vitro транскрипции, содержащего T7 (E2040S, NEB).

IV. Сайт-направленное редактирование гена TaGW2 пшеницы путем трансформации бомбардировкой частицами in vitro транскрибированной Cas9-mPHK и in vitro транскрибированной sgPHK.

1. Загрузка in vitro транскрибированной Cas9-mPHK и in vitro транскрибированной sgPHK в 0,6 нм золотой порошок.

5 мкл 0,6 нм золотого порошка, 3 мкл Cas9-mPHK, 1 мкл sgRNA-GW2-C14, 1 мкл 5 М уксуснокислого аммония, 20 мкл изопропанола смешивали и осаждали при -20°C в течение 1 ч, чтобы обеспечить соединение Cas9-mPHK и sgRNA-GW2-C14 с золотым порошком. Смесь центрифугировали 5 с при 1000 об/мин и промывали 100 мкл дегидратированного спирта после удаления супернатанта, затем снова центрифугировали 5 с при 1000 об/мин и ресуспендировали в 20 мкл дегидратированного спирта после удаления супернатанта.

2. Трансформация материалов-реципиентов пшеницы с использованием бомбардировки частицами.

1) Брали незрелые зародыши пшеницы сорта KN199 и погружали на 4 ч в гипертонический раствор.

2) Обстрел незрелых зародышей пшеницы, культивировавшихся в гипертоническом растворе на этапе 1), проводили посредством устройства для бомбардировки частицами. 20 мкл смеси sgPHK-Cas9-mPHK загружали на мембрану и проводили бомбардировку; расстояние от источника частиц составляло 6 см, сила давления - 1100 psi, диаметр ствола источника частиц - 2 см.

3) Незрелые зародыши пшеницы, подвергшиеся бомбардировке частицами на этапе 2), затем культивировали в гипертоническом растворе в течение 16 ч.

4) Незрелые зародыши пшеницы, культивировавшиеся в гипертоническом растворе на этапе 3), затем последовательно подвергали культивированию в индукционной среде в течение 14 дней для образования каллусной ткани, культивированию в среде для дифференциации в течение 28 дней и культивированию в среде для корнеобразования в течение 14-28 дней для получения растений пшеницы.

5) ДНК выделяли из проростков пшеницы, полученных на этапе 4), и проводили детекцию мутантов с геномным нокаутом (сайт-направленных) посредством ПЦР/RE-тестов (что касается конкретного метода, см. этап IV). Пшеницу сорта KN199 дикого типа использовали в качестве контроля.

Поскольку в целевом фрагменте эндогенного гена TaGW2 пшеницы имеется последовательность,

узнаваемая эндонуклеазой рестрикции XbaI, XbaI использовали для проведения ПЦР-RE тестов. Праймеры, использовавшиеся для ПЦР-амплификации, представляли собой праймеры, специфичные в отношении групп А, В и D, и имели следующие последовательности:

TaGW2-AF: 5'-CTGCCATTACTTTGTATTTTGGTAATA-3';

TaGW2-BF: 5'-GTTTCAGATGGCAATCTAAAAGTT-3';

TaGW2-DF: 5'-GCATGTACTTTGATTGTTTTCGCTGA-3';

TaGW2-R: 5'-TCCTTCTCTCTTACCACTTCCC-3'.

Результаты некоторых тестов детекции указывали на то, что в целевом участке гена TaGW2 пшеницы произошли мутации. Полоски выделяли для секвенирования. Результаты секвенирования показали, что в целевом участке гена TaGW2 пшеницы имела место инсерция/делеция (индел) (фиг. 1B и C).

Пример 2. Сайт-направленное редактирование гена OsBADH2 путем трансформации протопластов риса при помощи *in vitro* транскрибированной мПНК TALEN.

I. Целевой фрагмент TALEN.

Последовательность гена BADH2 риса показана в SEQ ID NO: 1.

Целевой фрагмент TALEN расположен в 4 экзоне гена BADH2 риса и имеет следующую последовательность:

5'-GCTGGATGCTTTGAGTActttgcagatcttgcagaATCCTTGGACAAAAGGC-3'

(позиции 1589-1640 последовательности SEQ ID NO: 1); строчными буквами в центре обозначена последовательность спейсера; фланкирующие прописные буквы означают последовательности, узнаваемые TALEN-модулями (обозначены как L-b и R-b). Подчеркнутые буквы представляют собой последовательность, узнаваемую BglII.

II. Дизайн и синтез кодирующих генов TALEN.

Белок TALEN, который узнает L-b в целевой последовательности, был обозначен как T-BADH2b-L, кодирующая последовательность показана в позициях 7-2952 SEQ ID NO: 2. В позициях 7-27 последовательности SEQ ID NO: 2 кодируется сигнал ядерной локализации (NLS); в позициях 463-2154 кодируется последовательность L-b, узнающая белок модуля; в позициях 2350-2953 (603 п.о.) кодируется эндонуклеаза Fok I.

Белок TALEN, который узнает R-b в целевой последовательности, был обозначен как T-BADH2b-R, кодирующая последовательность показана в позициях 3085-6018 SEQ ID NO: 2. В позициях 3085-3105 последовательности SEQ ID NO: 2 кодируется сигнал ядерной локализации (NLS); в позициях 3541-5232 кодируется последовательность L-b, узнающая белок модуля; в позициях 5428-6018 (591 п.о.) кодируется эндонуклеаза Fok I.

В позициях 2953-3006 последовательности SEQ ID NO: 2 кодируется T2A, состоящий из 18 аминокислот, который обеспечивает разделение T-BADH2b-L и T-BADH2b-R, экспрессируемых в той же экспрессионной кассете, на два отдельных белка.

III. *In vitro* синтез мПНК гена TALEN.

Два компонента TALEN гена BADH2 риса, BADH2b-L и T-BADH2b-R, *in vitro* транскрибировали при помощи набора для транскрипции мПНК (Ambion) с использованием промотора T7 для инициации транскрипции. Получали mRNA-L-T-OsBADH2b и mRNA-R-T-OsBADH2b, к их 3'-концам добавляли PolyA-хвосты, чтобы увеличить стабильность мПНК.

Последовательность mRNA-L-T-OsBADH2b показана в SEQ ID NO: 3, а последовательность mRNA-R-T-OsBADH2b - в SEQ ID NO: 4.

IV. Введение смеси двух мПНК TALEN, полученных путем *in vitro* транскрипции, в протопласты риса.

1. Приготовление материалов.

Использовали рис сорта Nirponbare. Семена промывали 75%-ным этанолом, затем обрабатывали 2,5%-ным гидрохлоридом натрия в течение 20 мин, более 5 раз промывали стерильной водой и культивировали на среде 1/2 MS в течение 7-10 дней при 26°C и длительности освещения 12 ч/сут (150 мкмоль/м²/с⁻¹). В большом стеклянном культуральном сосуде можно выращивать 15 семян. Для одного эксперимента требуется 40-60 семян, и количество выделяемых протопластов достаточно для трансформации 6 плазмид.

2. Выделение протопластов.

- 1) Протопласты выделяли из проростков и листовых влагалищ, из которых нарезали 0,5 мм нити;
- 2) нити сразу же помещали в 0,6 М раствор маннитола и выдерживали в течение 10 мин в темноте;
- 3) раствор маннитола удаляли путем фильтрации, нити помещали в раствор для энзимолитизации, проводили обработку в вакуумном насосе в течение 30 мин при -15~-20 (mmHg) в темноте;
- 4) пробы дополнительно переваривали в течение 4-5 ч при бережном встряхивании (на шейкере при скорости 10 об/мин);
- 5) после переваривания добавляли равный объем раствора W5 и раствор встряхивали 10 с для высвобождения протопластов;

6) протопласты фильтровали в 50-мл круглодонную центрифужную пробирку с использованием нейлоновой фильтровальной мембраны с размером пор 40 мкм и добавляли раствор W5 для промывки;

7) проводили центрифугирование 3 мин при 250 г для осаждения протопластов и супернатант сливали;

8) протопласты ресуспендировали в 10 мл W5, центрифугировали 5 мин при 250 г и супернатант сливали;

9) протопласты ресуспендировали путем добавления соответствующего количества раствора MMG. Концентрация протопластов составила 2×10^6 /мл, подсчет проводился при помощи гемоцитометра.

Примечание: все вышеуказанные этапы осуществлялись при комнатной температуре.

3. Трансформация протопластов.

1) 10 мкг mRNA-L-T-OsBADH2b и 10 мкг mRNA-R-T-OsBADH2b вносили в 2 мл центрифужную пробирку. Добавляли 200 мкл протопластов (около 4×10^5 клеток). Добавляли 220 мкл свежего раствора PEG и перемешивали. Трансформацию осуществляли 10-20 мин при комнатной температуре в темноте;

2) после трансформации медленно прибавляли 880 мкл W5 и перемешивали путем реверсивного вращения, проводили центрифугирование (250 г, 3 мин), супернатант сливали;

3) протопласты ресуспендировали путем добавления 1 мл WI и переносили в 6-луночный культуральный планшет (с заранее добавленным в луночки 1 мл раствора WI) и затем культивировали при комнатной температуре или 28°C в темноте в течение 6-16 ч (в течение 48 ч, если протопласты использовались для выделения геномной ДНК);

4. Проведение ПЦР/RE-экспериментов для анализа мутагенеза эндогенного гена BADH2 риса, получаемого в результате *in vitro* транскрипции TALEN.

Через 48 ч после трансформации протопластов выделяли геномную ДНК, которую использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР/RE (полимеразная цепная реакция/рестриктное расщепление). Одновременно протопласты риса сорта Nipponbare дикого типа использовали в качестве контроля. Анализ методом ПЦР/RE основывается на работе Shan, Q. и соавт. "Быстрая и эффективная модификация генов риса и *Brachyrodium* с использованием TALENs. *Molecular Plant* (2013)". Поскольку целевой фрагмент эндогенного гена BADH2 риса содержит последовательность узнавания эндонуклеазы рестрикции BglII, то эндонуклеазу рестрикции BglII использовали в эксперименте по проведению ПЦР/RE-теста. Для проведения ПЦР-амплификации использовались следующие праймеры:

OsBADH-F: 5'-GATCCCGCAGCGGCAGCTCTTCGTCG-3';

OsBADH2-R: 5'-GAGGAATAAAATCTCAAATGTCTTCAACTT-3'.

Результаты ПЦР/RE экспериментов можно видеть на фиг. 2B. Эти результаты показали, что в целевом участке гена BADH2 происходили мутации, эффективность мутагенеза составила около 5%. Полоски на фигуре были выделены и секвенированы, результаты секвенирования показали, что в целевом участке гена BADH2 имела место инсерция/делеция (индел) (фиг. 2C).

Пример 3. Экспрессия и очистка белков TALEN в прокариотической системе экспрессии и их трансформация в протопластах пшеницы или незрелых зародышах для сайт-направленной модификации гена MLO.

I. Отбор целевых последовательностей и дизайн TALENs.

Консервативную область в экзоне 2 гена MLO пшеницы использовали в качестве целевой последовательности для дизайна пары TALENs (состоящей из белка TAL-MLO-L и белка TAL-MLO-R; белок TAL-MLO-L включает два функциональных фрагмента, в частности фрагмент, специфически связывающийся с нуклеотидами вверх по течению целевой последовательности, и эндонуклеазу Fok I с мутацией EL; белок TAL-MLO-R включает два функциональных фрагмента, в частности фрагмент, специфически связывающийся с нуклеотидами вниз по течению целевой последовательности, и эндонуклеазу Fok I с мутацией KK). Целевые последовательности этих TALENs в генах TaMLO-A, TaMLO-B и TaMLO-D следующие:

Ген TaMLO-A:

5'-TCGCTGCTGCTCGCCGTcagcaggacccaatccCGGGATATGCATCTC

CCA-3';

Ген TaMLO-B:

5'-TCGCTGCTGCTCGCCGTgagcaggacccaatctcCGGGATATGCATCTC

CGA-3';

Ген TaMLO-D:

5'-TCGCTGCTGCTCGCCGTgagcaggacccaatctcCGGGATATGCATCTC

CGA-3'.

В клетке пшеницы, когда фрагмент TAL-L и фрагмент TAL-R связываются с соответствующей связывающей областью, две различные мономерные эндонуклеазы Fok I (эндонуклеаза Fok I с мутацией EL и эндонуклеаза Fok I с мутацией KK) образуют димерную эндонуклеазу Fok I, которая вызывает расщепление в области целевой последовательности (включая как целевую последовательность, так и фланкирующие последовательности) с образованием двухцепочечного разрыва. В процессе репарации такого разрыва клеткой возникает ряд мутаций. В контексте настоящего изобретения "мутация" имеет широкое значение, включая инсерцию, делецию, замену и т.п., что в большинстве случаев приводит к потере функции гена.

В вышеуказанных целевых последовательностях подчеркнутая часть представляет собой последовательность узнавания эндонуклеазы рестрикции AvaII, которая может расщепляться AvaII. После образования разрыва, если возникает мутация и прерывает последовательность узнавания AvaII, то целевая последовательность не может разрезаться AvaII; если мутация не возникает, то целевая последовательность может разрезаться AvaII.

II. Экспрессия и очистка белков TALEN гена-мишени MLO в прокариотической системе экспрессии.

1. Конструирование прокариотических экспрессионных векторов для экспрессии белков TALEN.

1) Кодировочные области TAL-L (SEQ ID NO: 5) и TAL-R (SEQ ID NO: 6) гена TALEN встраивали в прокариотический экспрессионный вектор pGEX-4T и таким образом получали рекомбинантный вектор с кодирующей областью TAL-L (SEQ ID NO: 5), инсертированной между сайтами BamHI и XbaI pGEX-4T в прямом направлении, и кодирующей областью TAL-R (SEQ ID NO: 6), инсертированной между сайтами XbaI и BamHI pGEX-4T в прямом направлении. Рекомбинантным вектором трансформировали штамм BL21 E.coli. Позитивную колонию инокулировали в среде LB с добавлением ампициллина и хлорамфеникола и культивировали в течение ночи при 37°C. Затем культуру инокулировали в 5 мл свежеприготовленной среды LB в соотношении 1:100, культивировали при 37°C и 225 об/мин до оптической плотности OD₆₀₀≈0,5. 1 мл культуры брали в качестве отрицательного контроля (без индукции). Закладывали контроль с пустым вектором pGEX-4T с индукцией или без индукции. К остальной части культуры добавляли IPTG (конечная концентрация 1 мМ) для индуцирования экспрессии при 37°C и 225 об/мин в течение 8 ч.

2) Брали по 1 мл каждой контрольной или индуцированной культуры и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин для сбора бактериальных клеток, супернатант сливали. Клетки ресуспендировали путем добавления 50 мкл загрузающего белок буфера, кипятили 7 мин. Супернатант анализировали при помощи 10% SDS-PAGE. Молекулярный вес каждого белка TALEN составил 100 кДа. Аминокислотная последовательность белка TAL-MLO-L представлена в SEQ ID NO: 7. Аминокислотная последовательность белка TAL-MLO-R представлена в SEQ ID NO: 8.

2. Очистка белков TALEN.

Культуру бактерий центрифугировали при 4°C в течение 10 мин для сбора бактериальных клеток. К осадку добавляли 10 мл лизисного буфера (50 мМ Трис-HCl, 2 мМ EDTA, 100 мМ NaCl, 1 мг/мл лизоцима, pH 8,5), перемешивали в течение 45 мин на льду. После обработки ультразвуком осадок собирали путем центрифугирования, промывали 4 М имидазолом. Осадок, полученный после последующего центрифугирования, растворяли в 50 мМ фосфатном буфере (содержащем 8 М мочевины), pH 7,4 (фиг. 3А).

III. Введение очищенных белков TALEN в протопласты пшеницы для сайт-направленного редактирования гена MLO.

Очищенные белки TALEN против целевого участка гена MLO вводили в протопласты пшеницы сорта Bobwhite с использованием PEG-опосредованного подхода:

1. Выращивание сеянцев пшеницы.

Семена пшеницы растили в растильне при температуре 25±2°C, освещенности 1000 люкс, фотопериоде день/ночь 14 ч/16 ч, в течение около 1-2 недель.

2. Выделение протопластов.

1) Брали нежные листья пшеницы, из средней части листьев нарезали 0,5-1 мм нити с помощью лезвия, которые помещали в 0,6 М раствор маннитола (с использованием воды в качестве растворителя) и настаивали 10 мин в темноте. Затем смесь фильтровали через фильтр и помещали в 50 мл раствор для энзимолита на 5 ч для переваривания (0,5 ч энзимолит проводили в вакууме, затем 4,5 ч при медленном встряхивании при 10 об/мин).

Примечание: температура в течение энзимолита должна поддерживаться в пределах 20-25°C, реакция должна осуществляться в темноте; после реакции раствор следует аккуратно встряхивать для высвобождения протопластов.

2) Продукт энзимолита растворяли путем добавления 10 мл W5 и фильтровали в 50 мл круглодонной центрифужной пробирке с использованием нейлоновой фильтровальной мембраны с размером пор 75 мкм.

Примечание: Перед использованием нейлоновую фильтровальную мембрану следует погрузить в 75% (объемный процент) этанола, промыть водой и затем намочить в W5 в течение 2 мин.

3) Проводили центрифугирование (100 г, 3 мин, 23°C) и супернатант сливали.

4) Осадок суспендировали в 10 мл W5, помещали на лед на 30 мин; наконец, протопласты выпадали в осадок и супернатант сливали.

5) Протопласты суспендировали путем добавления необходимого количества раствора MMG и помещали на лед до трансформации.

Примечание: концентрацию протопластов необходимо определять путем микроскопии ($\times 100$). Количество протопластов составило от 2×10^5 /мл до 1×10^6 /мл.

3. Трансформация протопластов пшеницы.

1) 15 мкг белков TALEN (белок TAL-MLO-L и белок TAL-MLO-R, смешанные в равных количествах) или 20 мкг вектора T-MLO (контроль) вносили в 2 мл центрифужную пробирку. С помощью пипетки прибавляли 200 мкл выделенных протопластов, содержимое смешивали, слегка постукивая по пробирке пальцем, и затем отстаивали в течение 3-5 мин. Затем прибавляли 250 мкл PEG4000 и перемешивали, слегка постукивая по пробирке пальцем. Трансформация проходила в темноте в течение 30 мин.

2) Прибавляли 900 мкл W5 (комнатной температуры) и перемешивали путем реверсивного вращения, проводили центрифугирование (100 г, 3 мин) и супернатант сливали.

3) Прибавляли 1 мл W5 и перемешивали путем реверсивного вращения, затем содержимое аккуратно переносили в 6-луночный культуральный планшет (с заранее добавленным в луночки 1 мл W5) и культивировали при 23°C на протяжении ночи.

4. Проведение ПЦР/RE-экспериментов для анализа мутагенеза эндогенного гена MLO пшеницы, получаемого из очищенных белков TALEN.

Через 48 ч после трансформации протопластов пшеницы выделяли геномную ДНК, которую использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР/RE экспериментального анализа (полимеразная цепная реакция/рестриктное расщепление). Одновременно протопласты, трансформированные плазмидой T-MLO, или протопласты пшеницы сорта Bobwhite дикого типа использовали в качестве контроля. Анализ методом ПЦР/RE основывается на работе Shan, Q. и соавт. "Быстрая и эффективная модификация генов риса и Brachypodium с использованием TALENs. Molecular Plant (2013)". Поскольку целевой фрагмент эндогенного гена MLO пшеницы содержит последовательность узнавания эндонуклеазы рестрикции Avail, то эндонуклеазу рестрикции AvaII использовали в эксперименте по проведению ПЦР/RE-теста. Для проведения ПЦР-амплификации использовались следующие праймеры:

TaMLO-F: 5'-TCATCGTCTCCGTCTCCTGGAGCA-3';

TaMLO-R: 5'-TGGTATTCCAAGGAGGCGGTCTCTGTCT-3'.

Результаты ПЦР/RE экспериментов показали, что в целевом участке гена MLO происходили мутации. Полоски были выделены и секвенированы, результаты секвенирования показали, что в целевом участке гена MLO имела место инсерция/делеция (индел) (фиг. 3B и C).

IV. Сайт-направленное редактирование гена MLO путем введения белков TALEN с использованием бомбардировки частицами.

Обычно в процессе трансформации клеток экспрессионной плазмидой методом бомбардировки частицами используется золотой порошок в качестве переносчика для доставки в клетки ДНК-плазмиды. Однако в отношении белков золотой порошок не подходит в качестве переносчика, так как он трудно связывается с белком. В настоящем изобретении в качестве переносчика в процессе трансформации белков методом бомбардировки частицами используется кремнезем.

1. Загрузка белков в кремнезем.

В качестве переносчика использовали кремнезем Au-MSN с размером частиц 10 нм. 20 мг Au-MSN добавляли к 5 мл фосфатного буфера (PBS), pH 7,4, для разрушения ультразвуком, и затем прибавляли 7 мг белка TAL-MLO-L и белка TAL-MLO-R. Смесь взбалтывали при 22°C в течение 24 ч, центрифугировали при 12000 об/мин. Супернатант сливали. Осадок суспендировали в PBS-буфере.

2. Трансформация материалов-реципиентов пшеницы с использованием бомбардировки частицами.

1) Брали незрелые зародыши пшеницы сорта Bobwhite и погружали на 4 ч в гипертонический раствор.

2) Обстрел незрелых зародышей пшеницы, культивировавшихся в гипертоническом растворе на этапе 1), проводили посредством специального устройства для бомбардировки частицами. Частицы Au-MSN, загруженные белками TALEN (5 мкл, 20 мкг/мкл), загружали на мембрану и проводили бомбардировку; расстояние от источника частиц составляло 6 см, сила давления - 1100 psi, диаметр ствола источника частиц - 2 см.

3) Незрелые зародыши пшеницы, подвергшиеся бомбардировке частицами на этапе 2), затем культивировали в гипертоническом растворе в течение 16 ч.

4) Незрелые зародыши пшеницы, культивировавшиеся в гипертоническом растворе на этапе 3), затем последовательно подвергали культивированию в индукционной среде в течение 14 дней для образования каллусной ткани, культивированию в среде для дифференциации в течение 28 дней и культивированию в среде для корнеобразования в течение 14-28 дней для получения растений пшеницы.

5) ДНК выделяли из семян пшеницы, полученных на этапе 4), проводили детектирование мутан-

тов с геным нокаутом (сайт-направленным) посредством ПЦР/RE-тестов (что касается конкретного метода тестирования, см. этап III). Пшеницу сорта Bobwhite дикого типа использовали в качестве контроля.

Результаты детектирования, касающиеся некоторых мутантов, указывали на то, что в целевом участке гена MLO пшеницы произошли мутации. Полоски выделяли и секвенировали. Результаты секвенирования показали, что в целевом участке гена MLO имела место инсерция/делеция (индел).

Вышеуказанные результаты свидетельствуют о том, что сайт-направленное редактирование целевого участка может осуществляться путем введения белка-нуклеазы в пшеницу. Мутанты, получаемые этим методом, свободны от экзогенной ДНК, а вводимый белок разрушается растительной клеткой. Таким образом, мутанты, получаемые при помощи этого метода, представляют собой нетрансгенные растения, обладающие повышенной биобезопасностью.

Пример 4. Сайт-направленное редактирование гена TaGASR7 посредством котрансформации белком Cas9, экспрессированным и очищенным в прокариотической системе экспрессии, и *in vitro* транскрибированной sgPНК.

I. Дизайн целевого фрагмента: мишень-C5.

Мишень-C5: 5'-CCGCCGGGCACCTACGGCAAC-3'; (в гене TaGASR7, код доступа GenBank: EU095332, положение 248-268).

II. Прокариотическая экспрессия и очистка белка Cas9.

1. Ген Cas9 (оптимизированный по кодоновому составу генов растения и дополненный NLS на обоих концах) встраивали в прокариотический экспрессионный вектор pGEX-4T и получали рекомбинантный вектор с геном Cas9 последовательности SEQ ID NO: 9 (оптимизированный по кодоновому составу генов растения и дополненный NLS на обоих концах), инсертированный между BamHI и SpeI экспрессионного вектора pGEX-4T. Рекомбинантным вектором трансформировали штамм BL21 E.coli. Позитивную колонию инокулировали в среду LB с добавлением ампициллина и хлорамфеникола и культивировали в течение ночи при 37°C. Затем культуру инокулировали в 5 мл свежеприготовленной среды LB в соотношении 1:100, культивировали при 37°C и 225 об/мин до оптической плотности OD600≈0,5. 1 мл культуры брали в качестве отрицательного контроля (без индукции). Закладывали контроль с пустым вектором pGEX-4T с индукцией или без индукции. К остальной части культуры добавляли IPTG (конечная концентрация 1 mM) для индуцирования экспрессии при 37°C и 225 об/мин в течение 8 ч.

2. Брали по 1 мл каждой контрольной или индуцированной культуры и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин для сбора бактериальных клеток, супернатант сливали. Клетки ресуспендировали путем добавления 50 мкл загрузающего белок буфера, кипятили 7 мин. Супернатант анализировали при помощи 10% SDS-PAGE. Молекулярный вес каждого белка Cas9 составил 200 кДа. Аминокислотная последовательность белка Cas9 представлена в SEQ ID NO: 10.

3. Очистка белка Cas9.

Культуру бактерий центрифугировали при 4°C в течение 10 мин для сбора бактериальных клеток. К клеточному осадку добавляли 10 мл лизисного буфера (50 mM Трис-HCl, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 мг/мл лизоцима, pH 8,5), перемешивали в течение 45 мин на льду. После обработки ультразвуком осадок собирали путем центрифугирования, промывали 4 M имидазолом. Осадок, полученный после последующего центрифугирования, растворяли в 50 mM фосфатном буфере (содержащем 8 M мочевины), pH 7,4 (фиг. 4A).

III. *In vitro* транскрипция sgPНК целевого сайта.

1. Целевой сайт TaGASR7 встраивали в вектор pT7-gRNA.

C5 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую РНК, которая способна комплементарно связываться с мишенью-C5.

Были синтезированы следующие одноцепочечные олигонуклеотиды с липкими концами (подчернуты):

C5F 5'-CTTGTTGCCGTAGGTGCCCGG-3';

C5R: 5'-AAACCCGGGCACCTACGGCAA-3'.

Двухцепочечную ДНК с липкими концами создавали путем расщепления олигонуклеотидов и вставляли между двумя сайтами рестрикции BbsI в плазмиду pT7-gRNA, в результате чего получали плазмиду pT7-gRNA, содержащую сайт C5. Позитивный контроль плазмиды выполняли путем секвенирования. Рекомбинантная плаزمиды, полученная путем инсерции фрагмента ДНК, как показано в 5'-CTTGTGCCGTAGGTGCCCGG-3' в прямом направлении в сайте рестрикции BbsI плазмиды pT7-gRNA, была позитивной и была обозначена как pT7-gRNA-C5.

2. *In vitro* транскрипция sgPНК, содержащей целевой сайт TaGASR7.

С помощью промотора T7 для инициации транскрипции sgPНК гена TaGASR7 *in vitro* транскрибировали с использованием набора для *in vitro* транскрипции мPНК (Ambion) в sgRNA-GASR7-C5 (SEQ ID NO: 11) и к ее 3'-концу добавляли PolyA-хвост для увеличения стабильности мPНК.

IV. Редактирование гена TaGASR7 посредством котрансформации белком Cas9 и *in vitro* транскрибированной sgPНК протопластов пшеницы.

1. Протопласты готовили аналогично тому, как показано в примере 3.

2. Трансформация протопластов.

1) 15 мкг белка Cas9 и 20 мкг sgRNA-GASR7-C5 вносили в 2 мл центрифужную пробирку. Прибавляли 200 мкл протопластов (около 4×10^5 клеток), затем добавляли 250 мкл свежеприготовленного раствора PEG и перемешивали. Трансформация проходила в темноте в течение 30 мин;

2) прибавляли 900 мкл W5 (комнатной температуры) и перемешивали путем реверсивного вращения, проводили центрифугирование (100 г, 3 мин) и супернатант сливали;

3) прибавляли 1 мл W5 и перемешивали путем реверсивного вращения, затем содержимое аккуратно переносили в 6-луночный культуральный планшет (с заранее добавленным в луночки 1 мл W5) и культивировали при 23°C на протяжении ночи.

3. Проведение ПЦР/RE-экспериментов для анализа мутагенеза эндогенного гена TaGASR7 пшеницы, получаемого из очищенного белка Cas9 и *in vitro* транскрибированной sgPHK.

Через 48 ч после трансформации протопластов пшеницы выделяли геномную ДНК, которую использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР/RE экспериментального анализа (полимеразная цепная реакция/рестриктное расщепление). Одновременно протопласты пшеницы сорта Bobwhite дикого типа использовали в качестве контроля. Анализ методом ПЦР/RE основывается на работе Shan, Q. и соавт. "Быстрая и эффективная модификация генов риса и Brachypodium с использованием TALENs. Molecular Plant (2013)". Поскольку целевой участок (код доступа, GenBank: EU095332, положения 248-268) эндогенного гена TaGASR7 пшеницы (код доступа, GenBank: EU095332) содержит последовательность узнавания (5'-CCSGG-3') эндонуклеазы рестрикции NciI, то эндонуклеазу рестрикции NciI использовали в эксперименте по проведению ПЦР/RE-теста. Для проведения ПЦР-амплификации использовались следующие праймеры:

TaGASR7-F: 5'-GGAGGTGATGGGAGGTGGGGG-3';

TaGASR7-R: 5'-CTGGGAGGGCAATTCACATGCCA-3'.

Результаты ПЦР/RE экспериментов указывали на то, что в целевом участке гена TaGASR7 происходили мутации. Полоски, представленные на фигуре, были выделены и секвенированы, и результаты секвенирования показали, что в целевом участке гена TaGASR7 имела место инсерция/делеция (индел) (фиг. 4 В и С).

V. Сайт-направленное редактирование гена TaGASR7 пшеницы при участии очищенного белка Cas9 и *in vitro* транскрибированной sgPHK посредством трансформации с использованием бомбардировки частицами.

1. Загрузка очищенного белка Cas9 и *in vitro* транскрибированной sgPHK в кремнезем.

В качестве переносчика использовали кремнезем Au-MSN с размером частиц 10 нм. 20 мг Au-MSN добавляли к 5 мл фосфатного буфера (PBS), pH 7,4, для разрушения ультразвуком. Затем прибавляли 7 мг белка Cas9. Смесь взбалтывали при 22°C в течение 24 ч, центрифугировали при 12000 об/мин. Супернатант сливали. Клеточный осадок суспендировали в PBS-буфере. 4 мкл *in vitro* транскрибированной sgPHK (250 нг/мкл) прибавляли к 10 мкл белка-переносчика Cas9-Au-MSN (10 мкг/мкл). Затем добавляли 12,5 мкл 2,5 М CaCl₂ и 5 мкл 0,1 М спермидина, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 с, супернатант сливали. Au-MSN, несущий белок Cas9 и покрытый mPHK, промытый два раза 100%-ным этанолом и ресуспендированный в 5 мкл 100% этанола, обозначили sgRNA-Cas9-Au-MSN.

2. Трансформация материалов-реципиентов пшеницы с использованием бомбардировки частицами.

1) Брали незрелые зародыши пшеницы сорта Bobwhite и погружали на 4 ч в гипертонический раствор.

2) Обстрел незрелых зародышей пшеницы, культивировавшихся в гипертоническом растворе на этапе 1), проводили посредством специального устройства для бомбардировки частицами. 5 мкл sgRNA-Cas9-Au-MSN загружали на мембрану и проводили бомбардировку; расстояние от источника частиц составляло 6 см, сила давления - 1100 psi, диаметр ствола источника частиц - 2 см.

3) Незрелые зародыши пшеницы, подвергшиеся бомбардировке частицами на этапе 2), затем культивировали в гипертоническом растворе в течение 16 ч.

4) Незрелые зародыши пшеницы, культивировавшиеся в гипертоническом растворе на этапе 3), затем последовательно подвергали культивированию в индукционной среде в течение 14 дней для образования каллусной ткани, культивированию в среде для дифференциации в течение 28 дней и культивированию в среде для корнеобразования в течение 14-28 дней для получения растений пшеницы.

5) ДНК выделяли из семян пшеницы, полученных на этапе 4), проводили детектирование мутантов с геномным нокаутом (сайт-направленным) посредством ПЦР/RE-тестов (что касается конкретного метода тестирования, см. этап IV). Пшеницу сорта Bobwhite дикого типа использовали в качестве контроля.

Результаты детектирования, касающиеся некоторых мутантов, указывали на то, что в целевом участке гена TaGASR7 пшеницы произошли мутации. Полоски выделяли и секвенировали. Результаты секвенирования показали, что в целевом участке гена TaGASR7 имела место инсерция/делеция (индел).

Пример 5. Сайт-направленное редактирование эндогенного гена ZmIPK кукурузы путем введения очищенного белка Cas9 и sgPHK в растение посредством подхода с использованием прорастающих пыльцевых трубок.

I. Дизайн целевого фрагмента: мишень-C2.

Мишень-C2: 5'-CCGAGCTCGACCACGCCGCGGAC-3'; (положение 393-415 гена ZmIPK, как показано в GenBank, код доступа AY172635).

II. Прокариотическая экспрессия и очистка белка Cas9.

Идентично примеру 3, этап II.

III. In vitro транскрипция sgРНК целевого участка.

1. Целевой участок гена ZmIPK встраивали в вектор pT7-gRNA.

C2 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую РНК, которая способна комплементарно связываться с мишенью-C2.

Были синтезированы следующие одноцепочечные олигонуклеотиды с липкими концами (подчеркнуты):

C1-1F: 5'-AGCAGTCGGCGGGCGTGGTCGAGCT-3';

C1R: 5'-AAACAGCTCGACCACGCCGCGGAC-3'.

Путем расщепления олигонуклеотидов формировали двухцепочечную ДНК с липкими концами и инсертировали между двумя сайтами рестрикции BbsI в плазмиду pT7-gRNA, в результате чего получали плазмиду pT7-gRNA, содержащую сайт C2. Позитивный контроль плазмиды выполняли путем секвенирования. Рекомбинантная плазида, которая была получена путем инсертирования фрагмента ДНК, как показано в 5'-AGCAGTCGGCGGGCGTGGTCGAGCT-3' в прямом направлении в сайт рестрикции BbsI плазмиды pT7-gRNA, была позитивной и была обозначена как pT7-gRNA-C2.

2. In vitro транскрипция sgРНК, содержащей целевой участок гена ZmIPK.

С помощью промотора T7 для инициации транскрипции sgРНК гена ZmIPK in vitro транскрибировали с использованием набора для in vitro транскрипции mРНК (Ambion) в sgRNA-IPK-C2 (SEQ ID NO: 12) и к ее 3'-концу добавляли PolyA-хвост для увеличения стабильности mРНК.

IV. Сайт-направленное редактирование эндогенного гена ZmIPK пшеницы путем введения очищенного белка Cas9 и in vitro транскрибированной sgРНК посредством подхода с использованием прорастающих пыльцевых трубок.

В поле отбирали сильные растения инбредной линии кукурузы HiII в качестве материалов-реципиентов. Самоопыление растений проводили в 14:00-16:00 в солнечный день. Спустя 16-20 ч после опыления, а именно в 10:00-12:00 следующего дня, у реципиентов надрезали пестики. В надрезы закапывали смесь из 10 мкг/мкл белка Cas9 и 250 нг/мкл sgРНК. На рыльца надевали защитные мешочки до плодonoшения. Полученные семена кукурузы растили и выделяли геномную ДНК для использования в эксперименте ПЦР-RE в качестве матрицы. Параллельно кукурузу сорта HiII дикого типа использовали в качестве контроля. Анализ методом ПЦР/RE основывается на работе Shan, Q. и соавт. "Быстрая и эффективная модификация генов риса и Brachypodium с использованием TALENs. Molecular Plant (2013)". Поскольку целевой фрагмент (код доступа, GenBank: AY172635, положения 393-415) эндогенного гена ZmIPK кукурузы (код доступа, GenBank: AY172635) содержит последовательность узнавания (5'-GAGCTC-3') эндонуклеазы рестрикции SacI, то эндонуклеазу рестрикции Sad использовали в эксперименте по проведению ПЦР/RE-теста. Для проведения ПЦР-амплификации использовались следующие праймеры:

ZmIPK-1F: 5'-TCGCAGCCCCTGGCAGAGCAA-3';

ZmIPK-1R: 5'-GAGACCTGGGAGAAGGAGACGGATCC-3'.

Результаты ПЦР/RE экспериментов показали, что в целевом участке гена ZmIPK происходили мутации. Неразрезанные полоски были выделены и секвенированы, результаты секвенирования показали, что в целевом участке гена ZmIPK имела место инсерция/делеция (индел).

Пример 6. Сайт-направленное редактирование гена NtPVY путем котрансформации белком Cas9, экспрессированным и очищенным в прокариотической экспрессионной системе, и in vitro транскрибированной sgРНК протопластов табака, и регенерация растений.

I. Дизайн целевого фрагмента: мишень-P4.

Мишень P4: 5'-TGATACCAGCTGGCTATACACGG-3'.

II. Прокариотическая экспрессия и очистка белка Cas9 идентична примеру 3.

III. In vitro транскрипция sgРНК целевого участка.

1. Целевой участок NtPVY встраивали в вектор pHSN401.

P4 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую РНК, которая способна комплементарно связываться с мишенью-P4.

Были синтезированы следующие одноцепочечные олигонуклеотиды с липкими концами (подчеркнуты):

P4-F: 5'-ATTGTGATACCAGCTGGCTATACA-3';

P4-R: 5'-AAACTGTATAGCCAGCTGGTATCA-3'.

Путем расщепления олигонуклеотидов формировали двухцепочечную ДНК с липкими концами и инсертировали между двумя сайтами рестрикции BsaI в плазмиду pHSN401, в результате чего получали плазмиду pHSN401, содержащую P4. Позитивный контроль плазмиды выполняли путем секвенирования. Рекомбинантная плазида, которая была получена в результате инсертирования фрагмента ДНК, как показано в 5'-ATTGTGATACCAGCTGGCTATACA-3' в прямом направлении вверх в сайт рестрикции

BsaI плазмиды pHSN401, была позитивной и была обозначена как pHSN401-P4.

2. *In vitro* транскрипция sgPHK, содержащей целевой участок NtPVY.

С помощью промотора T7 для инициации транскрипции sgPHK гена NtPVY (SEQ ID NO: 13, 14, 15) *in vitro* транскрибировали с использованием набора для транскрипции mPHK (Ambion) в sgRNA-PVY-P4 (SEQ ID NO: 16).

IV. Редактирование гена NtPVY путем котрансформации белком Cas9 и *in vitro* транскрибированной sgPHK протопластов табака.

1. Приготовление материалов.

Использовали табак сорта Honghua Dajinyuan. Семена обрабатывали 20%-ным гипохлоритом натрия в течение 20 мин и промывали стерильной водой 5 раз. Затем семена культивировали на среде 1/2 MS при температуре 25°C и продолжительности освещения 16 ч.

2. Выделение протопластов.

1) Отбирали 6 листьев 30-дневных растений табака и вырезали сегменты длиной 1 см в стерильных условиях. Сегменты помещали в культуральный планшет, содержащий 15 мл раствора для энзимолита. Планшет запечатывали и держали в темноте при 25°C в течение ночи (наиболее предпочтительно в течение 12 ч).

2) После реакции энзимолита добавляли подходящее количество раствора W5. Планшет аккуратно встряхивали для высвобождения протопластов. Затем суспензию протопластов фильтровали через стерильный фильтр с размером пор 100 и 40 мкм, центрифугировали при 70 г в течение 5 мин, супернатант сливали.

3) Протопласты ресуспендировали путем добавления 5 мл 22%-го раствора сахарозы. Затем прибавляли 2 мл раствора W5 и центрифугировали при 70 г в течение 5 мин. После этого на границе раздела фаз сформировался слой протопластов.

4) Протопласты удаляли с границы раздела. Прибавляли 5 мл раствора W5 и перемешивали с последующим центрифугированием при 70 г в течение 5 мин.

5) Супернатант сливали. К ресуспендированным протопластам прибавляли 1 мл раствора для MMG трансформации. Выход протопластов определяли путем микроскопии.

3. Трансформация и регенерация протопластов.

1) 20 мкг белка Cas9 и 20 мкг mRNA-PVY-P4 вносили в 14 мл центрифужную пробирку. Добавляли 300 мкл протопластов (около 5×10^5 клеток), затем 300 мкл свежеприготовленного раствора PEG, перемешивали и держали в темноте 20 мин.

2) Прибавляли 10 мл раствора W5 и перемешивали, проводили центрифугирование при 70 г в течение 3 мин и супернатант сливали; этот этап повторяли.

3) Прибавляли 1 мл среды K3:H, содержащей 0,6% легкоплавкую агарозу (инкубированную на водяной бане при 40-45°C перед использованием), и перемешивали. Смесь использовали для трансформации в 30 мм стерильном культуральном планшете.

4) После затвердевания среды планшет держали в темноте 24 ч при 24°C, затем культивировали в темноте в течение еще 6 дней до начала клеточного деления.

5) Агарозный гель переносили в 90 мм культуральный планшет и добавляли подходящее количество жидкой среды А. Культивирование продолжали при 24°C в темноте.

6) Через 3-4 недели в планшете образовался видимый каллус. После культивирования в течение 5-6 недель диаметры каллуса достигли 8-10 мм.

7) Каллусы переносили в среду для дифференциации и культивировали 1-2 недели до появления на поверхности адвентивных почек.

8) Адвентивные почки длиной 3-4 см срезали и переносили в среду для корнеобразования для индукции образования корней до развития интактных растений.

9) По достижении корнями определенной длины сеянцы пересаживали в грунт.

Выделяли ДНК трансгенного табака и использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР/RE анализа (полимеразная цепная реакция/рестриктное расщепление). ДНК табака дикого типа использовали в качестве контроля. Анализ методом ПЦР/RE основывается на работе Shan, Q. и соавт. "Быстрая и эффективная модификация генов риса и *Brachypodium* с использованием TALENs. *Molecular Plant* (2013)". Поскольку целевой фрагмент эндогенного гена NtPVY табака содержит последовательность узнавания (5'-CAGCTG-3') эндонуклеазы рестрикции PvuII, то эндонуклеазу рестрикции PvuII использовали в эксперименте по проведению ПЦР/RE-теста. Для проведения ПЦР-амплификации использовались следующие праймеры:

NtPVY-F: 5'-TGGATTAGATGTTTTCAAATGC-3';

NtPVY-R: 5'-CATCTTTTGGGGACGGACAAA-3'.

Результаты ПЦР/RE экспериментов показали, что в результате котрансформации белком Cas9 и *in vitro* транскрибированной sgPHK протопластов табака в целевом участке гена NtPVY происходили мутации. Неразрезанные полоски были выделены и секвенированы, результаты секвенирования показали, что в целевом участке гена NtPVY имела место инсерция/делеция (индел) (фиг. 5A и B). Кроме того, в регенерированных трансгенных растениях табака также имела место мутация в целевом участке гена NtPVY. Результаты секвенирования показали, что в целевом участке гена NtPVY произошла инсерция/делеция (индел) (фиг. 5C).

Используемые растворы для выделения и культивирования протопласта табака указаны в следующих табл. 6-10.

Таблица 6

50-мл раствор для энзимолита

	Добавляемое количество	Окончательная концентрация
Целлюлоза R10	0,6	1,2%
Мацерозим R10	0,3	0,6%

доводили раствор до 50 мл добавлением среды К4, pH регулировали до 5,6 с помощью KOH; центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин; фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм

Таблица 7

500-мл W5

	Добавляемое количество	Окончательная концентрация
NaCl	4,5 г	154 мМ
CaCl ₂	9,189 г	125 мМ
KCl	0,1864 г	5 мМ
Глюкоза	0,45 г	5 мМ

доводили раствор водой двойной дистилляции до 500 мл, pH регулировали до 5,8 с помощью KOH, автоклавировали

Таблица 8

10-мл раствор для трансформации

	Добавляемое количество	Окончательная концентрация
Маннитол (0,8 М)	6,33 мл	0,5 М
MgCl ₂ (1 М)	0,15 мл	15 мМ
MES	0,01 г	0,1%

доводили раствор водой двойной дистилляции до 10 мл, pH регулировали до 5,8 с помощью KOH

Таблица 9

4-мл раствор PEG

	Добавляемое количество	Окончательная концентрация
PEG4000	1,6 г	40%
Маннитол (0,8 М)	2 мл	0,4 М
Ca(NO ₃) ₂		0,1 М

доводили раствор водой двойной дистилляции до 4 мл, pH регулировали до 8-9 с помощью KOH, автоклавировали

Таблица 10

Маточный раствор для выделения и культивирования протопластов табака

1000 мг/50 мл					
Среды (мл/л)	A	H	K3	MS	MS морфо
KNO ₃	50,5	95	125	95	95
NH ₄ NO ₃		40	30	12,5	82,5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	22	30	45	22	36,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	37	15	12,5	18,5	18,5
1000 мг/100 мл					
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	0	25	0	0
KH ₂ PO ₄	0	13,6	17	0	17
NaH ₂ PO ₄	0	0	15	0	0
(NH ₄)сукцинат	5	0	0	0	0
CaHPO ₄	0	0	0	5	0
Микроэлементы (MS микроэлементы 10x от Sigma, 100 мл/л)					
	100	100	100	100	100
Карбогидраты (г/л) в конечной концентрации					
Сахароза (+)	30	30	30	20	30
D-сорбитол	0	0	45,5	20	0
D-маннитал	0	0	45,5	20	0
Гормоны (мг/л в конечной концентрации)					
2,4-D	0	1,5	5	1,5	0
Кинетин	0	0	0	0	0,2
Витамины (мг/л в конечной концентрации)					
ПиридоксинHCl	0,5	0,5	0,5	1,5	0,5
Тиамин HCl	0,1	0,1	0,1	10	0,1
Витамин B3	0	0,5	0,5	0,5	0,5
Инозитол	100	100	100	100	100
Другие органические вещества (мг/л в конечной концентрации)					
Глицин	2	2	2	7,5	2
L-глутамин	0	0	0	877	0
L-аспарагин	0	0	0	266	0
Гидролизат казеина	400	400	400	0	0

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ осуществления сайт-направленной модификации целевого фрагмента гена-мишени растения, включающий введение ненаследуемого материала в ткань либо часть растения интереса с использованием бомбардировки частицами, характеризующийся тем, что ненаследуемый материал состоит из нуклеазы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами/CRISPR-ассоциированной системы, специфичной в отношении целевого фрагмента, или mРНК, способной экспрессировать нуклеазу, и направляющей РНК, при этом целевой фрагмент расщепляется нуклеазой, и сайт-направленная модификация целевого фрагмента достигается путем репарации ДНК растения, где направляющая РНК представляет собой РНК палиндромной структуры, образующуюся путем частичного спаривания оснований между sgРНК и tracrРНК, где sgРНК содержит фрагмент РНК, способный комплементарно связываться с целевым фрагментом, где указанная ткань представляет собой каллус, незрелый зародыш либо зрелый зародыш; а указанная часть растения представляет собой лист, вершину побега, соцветие либо пыльцевую трубку.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas9.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что ненаследуемый материал состоит из белка Cas9 либо mРНК, способной экспрессировать белок Cas9, и направляющей РНК, при этом направляющая РНК представляет собой РНК палиндромной структуры, которая представляет собой sgРНК, или образуется путем частичного спаривания оснований между sgРНК и tracrРНК, где sgРНК содержит фрагмент РНК, способный комплементарно связываться с целевым фрагментом.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что часть растения представляет собой часть интактного растения, в которую может быть введен ненаследуемый материал.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что ненаследуемый материал вводится в ткань либо часть растения интереса транзистентно.

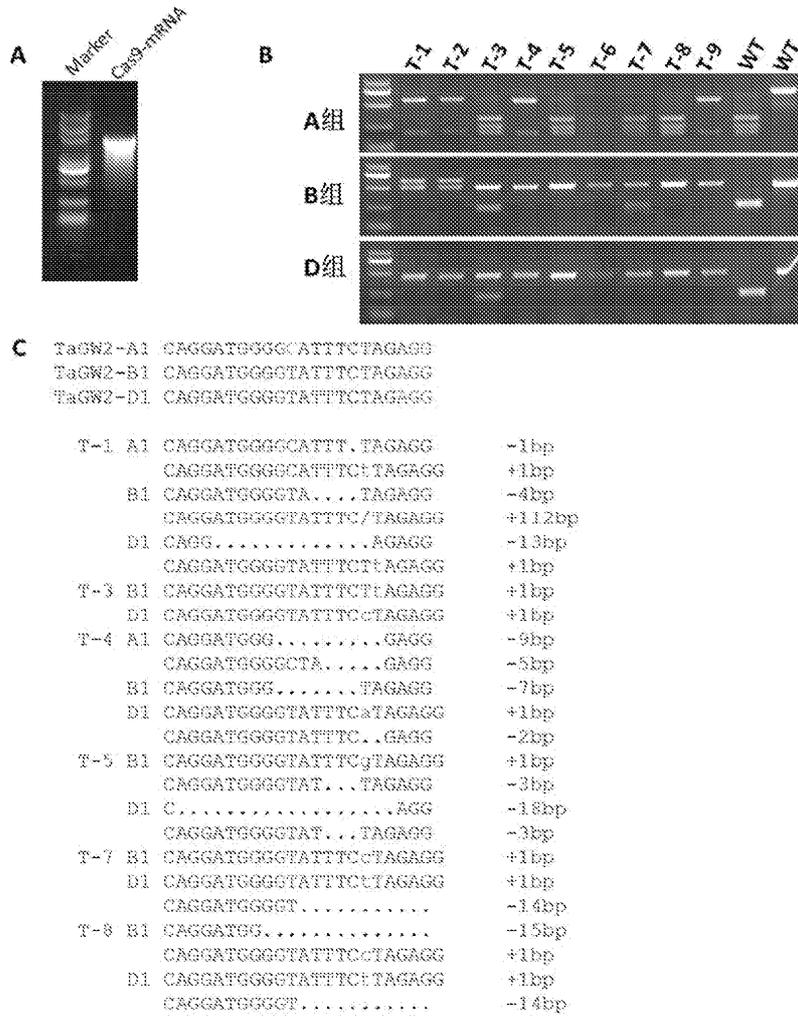
6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что сайт-направленная модификация представляет собой инсерцию, делецию и/или замену нуклеотида в целевом фрагменте.

7. Способ получения нетрансгенного мутантного растения, включающий следующие этапы:

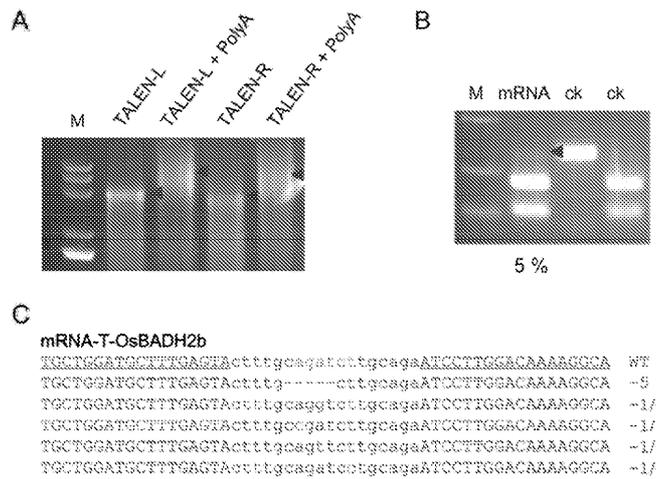
а) осуществление сайт-направленной модификации целевого фрагмента гена-мишени растения интереса согласно способу по любому из пп.1-6,

б) получение растения, в котором функции гена-мишени утрачены или изменены и геном которого свободен от внедренного экзогенного гена.

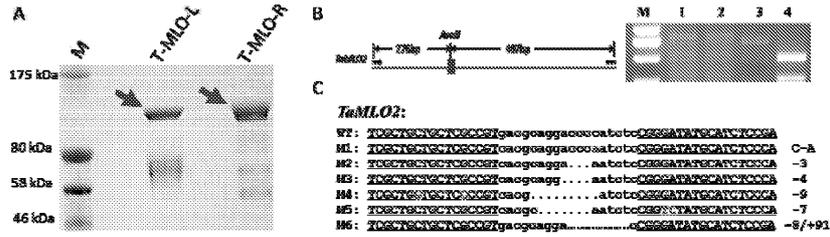
8. Способ по п.7, отличающийся тем, что на этапе б) клетка или ткань либо часть растения интереса регенерируется в интактное растение посредством культуры ткани.



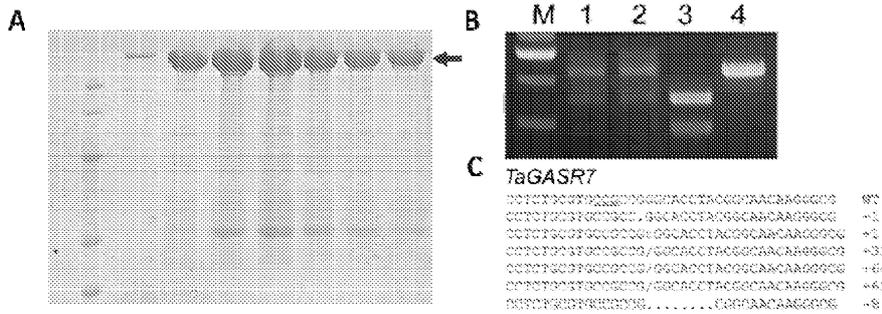
Фиг. 1



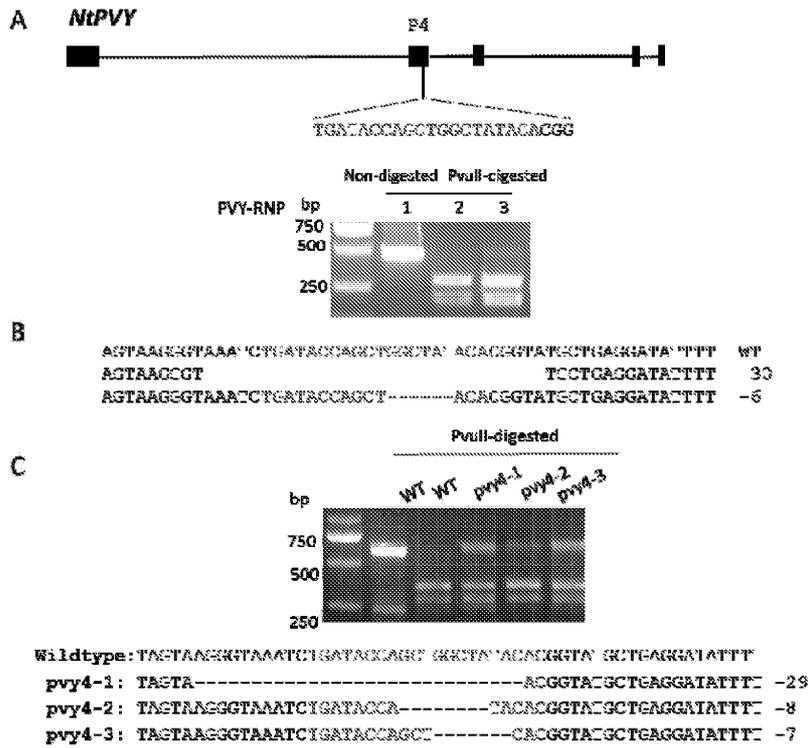
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5