(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190366 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.15

(22) Дата подачи заявки
2019.08.24

(51) Int. Cl. ***C12N 15/87*** (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A61K 8/97 (2017.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A01H 5/00 (2018.01)

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ РАСТЕНИЙ

(31) **62/722,694; 62/848,470**
(32) **2018.08.24; 2019.05.15**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/048045**
(87) **WO 2020/041782 2020.02.27**

(71) Заявитель:
ФЛЭГШИП ПАЙОНИРИНГ ИННОВЕЙШНЗ VI, ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:
Фан Ройен Мария Хелена Христине, Там Хок Хеи, Авенданьо Амадо Майер Стив, Мартин Барри Эндрю, Мартинес Игнасио, Ковальски Петр Станислав, Нуколова Наталия Владимировна, Ню Яцзе (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении раскрыты композиции для модификации растений, содержащие совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP) (например, предусматривающих растительную внеклеточную везикулу (EV) или ее сегмент, часть или экстракт), где PMP включают средство, модифицирующее растения, и где средство, модифицирующее растения, предусматривает гетерологичную РНК. Композиции в данном документе применимы в способах модификации растений таким образом, чтобы повысить приспособленность растения, где повышение приспособленности растения предусматривает ускорение роста, повышение урожайности, устойчивости к абиотическим стрессовым факторам или устойчивости к биотическим стрессовым факторам.

202190366 A1

202190366 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567304EA/011

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ РАСТЕНИЙ

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и тем самым включен посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная ASCII-копия, созданная 23 августа 2019 года, имеет название 51296-004WO3_Sequence_Listing_08.23.19_ST25 и размер 12136 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В сельском хозяйстве доставка биологически активных средств в растения для индуцирования требуемых модификаций растения может быть затруднена различным образом. Например, средства, модифицирующие растения, такие как нуклеиновые кислоты или пептиды, могут быть подвержены разложению во время доставки. Кроме того, средство, модифицирующее растение, должно проникнуть в различные части, ткани, сосудистую систему и/или клетки растения для того, чтобы модифицировать растение. Таким образом, в данной области техники имеется потребность в способах и композиции для эффективной доставки средств, модифицирующих растения, в растения.

Краткое описание изобретения

В данном документе раскрыты композиции для модификации растений, содержащие совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), которые несут средство, модифицирующее растения. Композиции в данном документе применимы в способах доставки средств, которые модифицируют растения, с помощью способа, при котором вводится требуемый признак растения, такой как повышение приспособленности растения.

В первом аспекте в данном документе представлен способ введения гетерологичной РНК в растение, причем способ предусматривает доставку в растение композиции, содержащей совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), при этом каждый из совокупности содержит гетерологичную РНК, где композицию доставляют в концентрации, эффективной для увеличения приспособленности растения.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная РНК представляет собой направляющую РНК (gRNA). В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК (gRNA) является компонентом рибонуклеопротеинового комплекса (RNP), и каждый из совокупности PMP содержит RNP.

В некоторых вариантах осуществления PMP представляют собой восстановленные из липидов PMP (LPMP).

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная РНК инкапсулирована с помощью PMP.

В некоторых вариантах осуществления каждый из PMP предусматривает очищенную растительную внеклеточную везикулу (EV).

В некоторых вариантах осуществления PMP в композиции находятся в

концентрации, эффективной для модификации признака растения, где модификация повышает приспособленность растения, например, ускоряет развитие, рост, повышает урожайность, устойчивость к абиотическим стрессовым факторам или устойчивость к биотическим стрессовым факторам. В некоторых вариантах осуществления повышение приспособленности растения представляет собой модификацию времени цветения, повышение приспособленности растения представляет собой повышение качества продуктов, собираемых с растения, улучшение вкуса, внешнего вида или срока хранения продукта, собираемого с растения, или снижение продуцирования аллергена, который стимулирует иммунный ответ у животного.

В другом аспекте в данном документе представлена композиция для модификации растений, содержащая совокупность PMP, где PMP содержат средство, модифицирующее растение. В некоторых вариантах осуществления PMP в композиции находятся в концентрации, эффективной для модификации признака растения, такого как приспособленность растения. В некоторых вариантах осуществления PMP в композиции находятся в концентрации, эффективной для повышения приспособленности растения.

В другом аспекте в данном документе представлена композиция для модификации растений, содержащая совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), где PMP содержат средство, модифицирующее растения, и PMP в композиции находятся в концентрации, эффективной для модификации признака растения, где модификация повышает приспособленность растения.

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, повышение приспособленности представляет собой ускорение развития, роста, повышение урожайности, устойчивости к абиотическим стрессовым факторам или устойчивости к биотическим стрессовым факторам. В некоторых вариантах осуществления повышение приспособленности растения представляет собой повышение устойчивости к болезням, засуховыносливости, жаровыносливости, холодовыносливости, солевыносливости, выносливости к металлам, выносливости к гербицидам, выносливости к химическим веществам, эффективности использования воды, использования азота, устойчивости к азотному стрессу, азотфиксации, устойчивости к вредителям, устойчивости к травоядным животным, устойчивости к патогенам, урожайности, урожайности в условиях ограниченного количества воды, жизнеспособности, роста, фотосинтетического потенциала, питания, содержания белка, содержания углеводов, содержания масла, биомассы, длины побегов, длины корней, показателя структуры корневой системы, образования семян, веса семян, образования завязи или количества собираемого урожая. В некоторых вариантах осуществления повышение приспособленности представляет собой более раннее цветение. В некоторых вариантах осуществления повышение приспособленности растения представляет собой повышение качества продуктов, собираемых с растения. В некоторых вариантах осуществления повышение приспособленности растения представляет собой улучшение вкуса, внешнего вида или срока хранения продукта, собираемого с растения. В некоторых вариантах

осуществления повышение приспособленности представляет собой снижение продуцирования аллергена, который стимулирует иммунный ответ у животного.

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, средство, модифицирующее растения, является гетерологичной нуклеиновой кислотой.

В другом аспекте в данном документе представлена композиция для модификации растений, содержащая совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), где PMP содержат гетерологичную нуклеиновую кислоту, и PMP в композиции находятся в концентрации, эффективной для модификации растения, где модификация повышает приспособленность растения.

В другом аспекте в данном документе представлена композиция для модификации растений, содержащая совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), где PMP содержат гетерологичную нуклеиновую кислоту, и PMP находятся в композиции в концентрации, эффективной для повышения приспособленности растения.

В некоторых вариантах осуществления, если средство, модифицирующее растения, является гетерологичной нуклеиновой кислотой, гетерологичная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК, РНК, PNA или гибридную молекулу ДНК-РНК. В некоторых вариантах осуществления РНК представляет собой матричную РНК (мРНК), направляющую РНК (gRNA) или ингибирующую РНК. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая РНК представляет собой RNAi, shRNA или miRNA. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая РНК подавляет экспрессию гена в растении.

В некоторых вариантах осуществления, если средство, модифицирующее растения, является гетерологичной нуклеиновой кислотой, нуклеиновая кислота представляет собой мРНК, модифицированную мРНК или молекулу ДНК, которые повышают экспрессию фермента, порообразующего белка, сигнального лиганда, проникающего в клетку пептида, транскрипционного фактора, рецептора, антитела, нанотела, белка для редактирования генов, рибопротеина, белкового аптамера или шаперона в растении. В некоторых вариантах осуществления повышение экспрессии в растении представляет собой повышение экспрессии на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, экспрессией в необработанном растении). В некоторых вариантах осуществления повышение экспрессии в растении представляет собой повышение экспрессии в приблизительно 2 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 10 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 25 раз, приблизительно 50 раз, приблизительно 75 раз или приблизительно 100 раз или больше по сравнению с референтным уровнем (например, экспрессией в необработанном растении).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловую РНК, siRNA, shRNA, miRNA, aiRNA, PNA, морфолиновую нуклеиновую кислоту, LNA, piRNA, рибозим, ДНКзим, аптамер, circRNA, gRNA или молекулу ДНК,

которые снижают экспрессию фермента, транскрипционного фактора, секреторного белка, структурного фактора, рибопротеина, белкового аптамера, шаперона, рецептора, сигнального лиганда или транспортера в растении. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии в растении является снижением экспрессии на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, экспрессией в необработанном растении). В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии в растении представляет собой снижение экспрессии в приблизительно 2 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 10 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 25 раз, приблизительно 50 раз, приблизительно 75 раз или приблизительно 100 раз или больше по сравнению с референтным уровнем (например, экспрессией в необработанном растении).

В некоторых вариантах осуществления, если средство, модифицирующее растения, является гетерологичной нуклеиновой кислотой, гетерологичная нуклеиновая кислота представляет собой конструкцию, которая не интегрируется в геном растения. В других вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота представляет собой конструкцию, которая интегрируется (например, стабильно интегрируется) в геном растения.

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, средство, модифицирующее растения, является гетерологичным пептидом. В некоторых вариантах осуществления пептид представляет собой фермент, порообразующий белок, сигнальный лиганд, проникающий в клетку пептид, транскрипционный фактор, рецептор, антитело, нанотело, белок для редактирования генов, рибопротеин, белковый аптамер или шаперон. В некоторых вариантах осуществления пептид снижает экспрессию гена в растении. В некоторых вариантах осуществления пептид повышает экспрессию гена в растении.

В еще одном аспекте в данном документе представлена композиция для модификации растений, содержащая совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), где PMP содержат гетерологичный пептид, и PMP в композиции находятся в концентрации, эффективной для повышения приспособленности растения. В некоторых вариантах осуществления пептид представляет собой фермент, порообразующий белок, сигнальный лиганд, проникающий в клетку пептид, транскрипционный фактор, рецептор, антитело, нанотело, белок для редактирования генов, рибопротеин, белковый аптамер или шаперон. В некоторых вариантах осуществления пептид снижает экспрессию гена в растении. В некоторых вариантах осуществления пептид повышает экспрессию гена в растении.

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, PMP содержат два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) разных средств, модифицирующих растения. В некоторых вариантах осуществления два или более различных средств, модифицирующих растения, содержат гетерологичную нуклеиновую кислоту и гетерологичный пептид. В определенных вариантах

осуществления гетерологичное средство, модифицирующее растения, является средством, приведенном в разделе, озаглавленном "Гетерологичные средства, модифицирующие растения", в "Подробном описании" в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, средство, модифицирующее растения, инкапсулировано с помощью PMP.

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, средство, модифицирующее растения, встроено в поверхность PMP.

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, средство, модифицирующее растения, конъюгировано с поверхностью PMP.

В некоторых вариантах осуществления композиция является стабильной в течение по меньшей мере 24 часов (например, по меньшей мере 24 часов, 30 часов или 40 часов), по меньшей мере 48 часов (например, по меньшей мере 48 часов (= 2 дней), 3 дней, 4 дней, 5 дней или 6 дней), по меньшей мере семи дней (например, по меньшей мере семи дней (= 1 недели), по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель или по меньшей мере 4 недель) или по меньшей мере 30 дней (например, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 60 дней или по меньшей мере 90 дней). В некоторых вариантах осуществления композиция является стабильной при температуре, составляющей по меньшей мере 24°C (например, по меньшей мере 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 37°C, 42°C или более 42°C), по меньшей мере 20°C (например, по меньшей мере 20°C, 21°C, 22°C или 23°C), по меньшей мере 4°C (например, по меньшей мере 5°C, 10°C или 15°C), по меньшей мере -20°C (например, по меньшей мере -20°C, -15°C, -10°C, -5°C или 0°C) или по меньшей мере -80°C (например, по меньшей мере -80°C, -70°C, -60°C, -50°C, -40°C или -30°C). В некоторых вариантах осуществления PMP являются стабильными в жидком азоте (приблизительно -195,8°C). В некоторых вариантах осуществления композиция является стабильной в течение по меньшей мере одного дня при комнатной температуре и/или стабильной в течение по меньшей мере одной недели при 4°C. В некоторых вариантах осуществления композиция является стабильной при воздействии УФ-излучения. В некоторых вариантах осуществления композиция является стабильной в течение периода времени, определенного в данном документе, при температуре естественной среды обитания растения.

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, PMP могут содержать совокупность белков (т. е. белков PMP), и концентрацию PMP можно измерять как концентрацию находящихся в них белков PMP. В некоторых вариантах осуществления совокупность PMP в композиции находится при концентрации, составляющей по меньшей мере 0,025 мкг белка PMP/мл (например, по меньшей мере 0,025, 0,05, 0,1 или 0,5 мкг белка PMP/мл), по меньшей мере 1 мкг белка PMP/мл (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 мкг белка PMP/мл), по меньшей мере 10 мкг белка PMP/мл (например, по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, или 45 мкг белка PMP/мл), по меньшей мере 50 мкг белка PMP/мл (например, по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 мкг белка PMP/мл), по меньшей мере 100 мкг

белка PMP/мл (например, по меньшей мере 100, 125, 150, 175, 200 или 225 мкг белка PMP/мл), по меньшей мере 250 мкг белка PMP/мл (например, по меньшей мере 250, 300, 350, 400, 450 или 500 мкг белка PMP/мл) или по меньшей мере 500 мкг белка PMP/мл (например, по меньшей мере 500, 600, 700, 800 или 900 мкг белка PMP/мл). В некоторых вариантах осуществления совокупность PMP в композиции находится при концентрации, составляющей по меньшей мере 1 мг белка PMP/мл (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 мг белка PMP/мл) или по меньшей мере 10 мг белка PMP/мл (например, по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг PMP белка/мл).

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, PMP предусматривают очищенную растительную внеклеточную везикулу (EV) или ее сегмент или экстракт. В некоторых вариантах осуществления растительная EV представляет собой модифицированную растительную внеклеточную везикулу (EV). В определенных вариантах осуществления растительная EV представляет собой растительную экзосому или растительную микровезикулу. В некоторых вариантах осуществления PMP содержат маркер растительной EV, такой как маркеры, указанные в приложении.

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, совокупность PMP может быть чистой. Например, композиция может практически не содержать (например, содержать менее 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 2%) органелл растительной клетки, таких как хлоропласты, митохондрии или ядра.

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, растение является сельскохозяйственным или садовым растением. В некоторых вариантах осуществления сельскохозяйственное растение представляет собой растение сои, растение пшеницы, растение кукурузы, растение томата или растение люцерны.

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, композиция составлена для доставки в растение. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для доставки в лист, пыльцу, семя, корень, плод, побег или цветок растения. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель.

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, композиция составлена для стабилизации PMP.

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, композиция для модификации растений не является пестицидной.

В некоторых вариантах осуществления композиций, описанных в данном документе, композиция составлена в виде жидкой, твердой, аэрозольной, пастообразной, гелеобразной или газообразной композиции.

В другом аспекте в данном документе представлена композиция для модификации растений, содержащая совокупность PMP, где PMP получены посредством способа, который включает стадии: (a) получения исходного образца из растения или его части, где

растение или его часть содержат EV; (b) выделения фракции неочищенных PMP из исходного образца, где фракция неочищенных PMP характеризуется сниженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце; (c) очистки фракции неочищенных PMP, за счет чего получают совокупность чистых PMP, где совокупность чистых PMP характеризуется сниженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV; (d) загрузки совокупности чистых PMP средством, модифицирующим растения; и необязательно (e) составления PMP из стадии (d) для доставки в растение. В другом аспекте в данном документе представлено растение, содержащее любую из композиций для модификации растений, представленных в данном документе.

В еще одном аспекте в данном документе представлен способ доставки композиции для модификации растений в растение, включающий приведение растения в контакт с композицией, представляющей собой любую из композиций для модификации растений, представленных в данном документе.

В другом аспекте в данном документе представлен способ модификации растения, при этом способ включает доставку в растение эффективного количества любой из композиций для модификации растений, представленных в данном документе, где способ обеспечивает модификацию растения и за счет этого осуществляет введение или усиление полезного признака в растении (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В другом аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает доставку в растение эффективного количества любой из композиций для модификации растений, представленных в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, композицию для модификации растений доставляют в лист, семя, пыльцу, корень, плод, побег, цветок или их часть. В некоторых вариантах осуществления композицию для модификации растений доставляют в клетку растения. В некоторых вариантах осуществления композицию для модификации растений доставляют в растительный протопласт. В некоторых вариантах осуществления композицию для модификации растений доставляют в ткань растения. Например, композицию можно доставлять в меристематическую ткань растения (например, апикальную меристему, латеральную меристему или интеркалярную меристему). В некоторых случаях композицию доставляют в постоянную ткань растения (например, простые ткани (например, паренхиму,

колленхиму или склеренхиму) или сложную постоянную ткань (например, ксилему или флоэму)). В некоторых случаях композицию доставляют в зародыш растения.

В другом аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает приведение пыльцы растения в контакт с эффективным количеством любой из композиций для модификации растений, представленных в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В другом аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает приведение семени растения в контакт с эффективным количеством любой из композиций для модификации растений, раскрытых в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В другом аспекте в данном документе представлен способ, включающий приведение протопласта растения в контакт с эффективным количеством любой из композиций для модификации растений, представленных в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В другом аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает приведение растительной клетки растения в контакт с эффективным количеством любой из композиций для модификации растений, представленных в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В другом аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает приведение меристематической ткани растения в контакт с эффективным количеством любой из композиций для модификации растений, представленных в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В другом аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает приведение зародыша растения в контакт с эффективным количеством любой из композиций для модификации растений, представленных в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%,

40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, повышение приспособленности представляет собой ускорение (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) развития, роста, повышение урожайности, устойчивости к абиотическим стрессовым факторам или устойчивости к биотическим стрессовым факторам.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, повышение приспособленности растения представляет собой повышение (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) устойчивости к болезням, засуховыносливости, жаровыносливости, холодовыносливости, солевыносливости, выносливости к металлам, выносливости к гербицидам, выносливости к химическим веществам, эффективности использования воды, использования азота, устойчивости к азотному стрессу, азотфиксации, устойчивости к вредителям, устойчивости к травоядным животным, устойчивости к патогенам, урожайности, урожайности в условиях ограниченного количества воды, жизнеспособности, роста, фотосинтетического потенциала, питания, содержания белка, содержания углеводов, содержания масла, биомассы, длины побегов, длины корней, показателя структуры корневой системы, образования семян, веса семян, образования завязи или количества собираемого урожая. В некоторых вариантах осуществления повышение приспособленности представляет собой более раннее цветение. В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, повышение приспособленности растения представляет собой повышение (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) качества продуктов, собираемых с растения.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, повышение приспособленности растения представляет собой улучшение вкуса или внешнего вида продукта, собираемого с растения.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, повышение приспособленности растения представляет собой увеличение срока хранения продукта, собираемого с растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%).

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, повышение приспособленности представляет собой снижение (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) продуцирования аллергена (например, пыльцы), который стимулирует иммунный ответ у животного (например, человека).

В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в данном документе, растение представляет собой сельскохозяйственное или садовое растение. В некоторых вариантах осуществления растение представляет собой растение сои, растение

пшеницы, растение кукурузы, растение томата или растение люцерны.

В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в данном документе, композицию для модификации растений доставляют в виде жидкости, твердого вещества, аэрозоля, пасты, геля или газообразного вещества.

В другом аспекте в данном документе представлен состав для использования в сельском хозяйстве, содержащий любую композицию, описанную в данном документе, и носитель или вспомогательное вещество, подходящие для применения в сельском хозяйстве. Состав может находиться в жидкой, твердой (например, в виде гранулы, брикета, порошка, сухого сыпучего или смачиваемого порошка), аэрозольной, пастообразной, гелеобразной или газообразной форме. Состав может быть выполнен (и/или объединен согласно инструкциям) с возможностью разбавления (например, композиция представляет собой растворимое твердое вещество или диспергируемое в воде твердое вещество), распыления, покрывания, инъекции или нанесения на растение, почву или семена.

В другом аспекте в данном документе представлены наборы, содержащие любую композицию, описанную в данном документе, и инструкции по применению в качестве композиции для модификации растений. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов PMP представляют собой восстановленные из липидов PMP (LPMP). В некоторых вариантах осуществления LPMP содержат экзогенный катионный липид. В некоторых вариантах осуществления каждый из модифицированных PMP содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% катионного липида. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой DOTAP или DC-холестерин.

Другие характеристики и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и формулы изобретения.

Определения

Используемый в данном документе термин "композиция для модификации растений" относится к композиции, содержащей совокупность PMP, где PMP содержат средство, модифицирующее растения.

Используемые в данном документе "обеспечение доставки" или "приведение в контакт" относятся к применению в отношении растения композиции для модификации растений путем нанесения либо непосредственно на растение, либо вблизи растения в участке, где композиция является эффективной для изменения приспособленности растения. В способах, где осуществляется непосредственный контакт композиции с растением, композиция может быть приведена в контакт с целым растением или только частью растения.

Используемый в данном документе термин "эффективное количество", "эффективная концентрация" или "концентрация, эффективная для" относится к количеству PMP или гетерологичного средства, модифицирующего растения, в нем (например, полинуклеотида или пептида), достаточному для обеспечения указанного

результата, например, обеспечения модификации растения (например, повышения приспособленности растения) или достижения целевого уровня (например, заранее определенного или порогового уровня) в целевом растении или на нем.

Используемый в данном документе термин "составленный для доставки в растение" относится к композиции для модификации растений, которая содержит приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель. Используемый в данном документе "приемлемый с точки зрения сельского хозяйства" носитель или вспомогательное вещество представляет собой носитель или вспомогательное вещество, которые подходят для применения в сельском хозяйстве, например, для применения по отношению к растениям. В определенных вариантах осуществления приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель или вспомогательное вещество не оказывают чрезмерные неблагоприятные побочные эффекты на растения, окружающую среду или людей или животных, которые употребляют полученные сельскохозяйственные продукты, производимые из них, соразмерно с приемлемым соотношением польза/риск.

Используемое в данном документе "повышение приспособленности растения" относится к повышению приспособленности растения, происходящему непосредственно вследствие контакта с композицией для модификации растений, описанной в данном документе, и оно включает, например, улучшение урожайности, улучшение жизнеспособности растения или улучшение качества или количества продукта, собираемого с растения, улучшение признаков, имеющихся до или после сбора урожая, которые требуются для сельского хозяйства или садоводства (например, вкуса, внешнего вида, срока хранения), или улучшение признаков, которые иным образом приносят пользу людям (например, понижение продуцирования аллергенов). Улучшение урожайности растения относится к повышению урожайности продукта (например, как измерено по биомассе растения, урожайности зерна, семян или плодов, содержанию белка, содержанию углеводов или масел или площади листьев) растения на измеримую величину по сравнению с урожаем того же продукта растения, полученного в тех же условиях, но без применения композиций по настоящему изобретению, или по сравнению с применением традиционных средств, модифицирующих растения (например, средств, модифицирующих растения, доставляемых без использования PMP). Например, урожайность может быть повышена на по меньшей мере приблизительно 0,5%, приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100% или более 100%. Урожайность может выражаться в единицах количества по массе или объему растения или продукта растения на некоторой основе. Основа может выражаться в единицах времени, площади выращивания, веса полученных растений или количества используемого сырья. Повышение приспособленности растения также можно измерять иным способом, как, например, по повышению или улучшению показателя

жизнеспособности, увеличению густоты (количества растений на единицу площади), увеличению высоты растения, увеличению окружности стебля, увеличению листового полога, улучшению внешнего вида (например, более зеленому цвету листьев, оцениваемому визуально), улучшению оценки корней, увеличению всхожести проростков, содержанию белка, увеличению размера листьев, увеличению количества листьев, уменьшению количества мертвых прикорневых листьев, увеличению силы ростков, уменьшению потребности в питательных веществах или удобрениях, увеличению всхожести семян, увеличению продуктивности ростков, увеличению цветения, ускорению созревания семян или зерна или зрелости семян, уменьшению полегания растений (вылегания), усиленному росту побегов или любой комбинации этих факторов на измеримую или заметную величину по сравнению с тем же фактором растения, производимого в тех же условиях, но без введения композиций по настоящему изобретению или с применением традиционных средств для использования в сельском хозяйстве.

Используемый в данном документе термин "гетерологичный" относится к средству (например, средству, модифицирующему растения), которое является либо (1) экзогенным по отношению к растению (например, происходит из источника, который не является растением или частью растения, из которых получен PMP) (например, добавлено к PMP с использованием подходов загрузки, описанных в данном документе), либо (2) эндогенным по отношению к растительной клетке или ткани, из которых получен PMP, однако присутствует в PMP (например, добавлено к PMP с использованием подходов загрузки, описанных в данном документе, подходов генетической инженерии *in vitro или in vivo*) при концентрации, которая превышает обнаруженную в природе (например, превышает концентрацию, обнаруженную во встречающейся в природе внеклеточной растительной везикуле).

Используемый в данном документе термин "функциональное средство" относится к средству (например, пептиду или нуклеиновой кислоте), которое связано или может быть связано с PMP (например, загружено в PMP или на них (например, инкапсулировано, встроено или конъюгировано с PMP) с использованием способов in vivo или in vitro и способно обеспечивать указанный результат (например, модификацию растения) в соответствии с композициями или способами по настоящему изобретению.

Используемые в данном документе термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" являются взаимозаменяемыми и относятся к РНК или ДНК, которые являются линейными или разветвленными, одно- или двухнитевыми или их гибридами, независимо от длины (например, содержат по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000 или более нуклеотидов). Термин также охватывает гибриды РНК/ДНК. Как правило, нуклеотиды в нуклеиновой кислоте связаны посредством фосфодиэфирных связей, хотя термин "нуклеиновая кислота" также охватывает аналоги нуклеиновых кислот, имеющие другие типы связей или остовов (например, фосфорамидные, фосфотиоатные, фосфодитиоатные, O-

метилфосфорамидатные, морфолиновые, запертые нуклеиновые кислоты (LNA), глицериновые нуклеиновые кислоты (GNA), нуклеиновые кислоты с треозой (TNA) и связи или остовы пептидных нуклеиновых кислот (PNA), среди прочего). Нуклеиновые кислоты могут быть однонитевыми, двухнитевыми или содержать части как однонитевой, так и двухнитевой последовательности. Нуклеиновая кислота может содержать любую комбинацию дезоксирибонуклеотидов и рибонуклеотидов, а также любую комбинацию оснований, в том числе, например, аденин, тимин, цитозин, урацил и модифицированные или неканонические основания (в том числе, например, гипоксантин, ксантин, 7-метилгуанин, 5,6-дигидроурацил, 5-метилцитозин и 5-гидроксиметилцитозин).

Используемый в данном документе термин "пептид", "белок" или "полипептид" охватывает любую цепь из встречающихся в природе или не встречающихся в природе аминокислот (как D-, так и L-аминокислот) независимо от длины (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 100 или больше аминокислот), наличия или отсутствия посттрансляционных модификаций (например, гликозилирования или фосфорилирования) или наличия, например, одной или нескольких групп, отличных от аминоацильных (например, углеводных, липидных и т. д.), ковалентно связанных с пептидом, и включает, например, природные белки, синтетические или рекомбинантные полипептиды и пептиды, гибридные молекулы, пептоиды или пептидомиметики.

Используемый в данном документе "процент идентичности" между двумя последовательностями определяют с помощью алгоритма BLAST 2.0, который описан в Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является общедоступным благодаря Национальному центру биотехнологической информации.

Используемый в данном документе термин "растение" относится к целым растениям, органам растений, растительным тканям, растительным клеткам, семенам и их потомству. Растительные клетки включают без ограничения клетки из семян, суспензионных культур, зародышей, участков меристем, каллюсной ткани, листьев, корней, побегов, гаметофитов, спорофитов, пыльцы и микроспор. Части растений включают дифференцированные и недифференцированные ткани, в том числе без ограничения следующее: корни, стебли, побеги, листья, пыльцу, семена, плоды, собранный продукт, опухолевую ткань, сок (например, ксилемный сок и флоэмный сок) и различные формы клеток и культуры (например, отдельные клетки, протопласты, зародыши и каллюсная ткань). Растительная ткань может находиться в растении или в органе, ткани или культуре растительных клеток. Кроме того, растение может быть подвергнуто генетической инженерии для продуцирования гетерологичного белка или РНК, например, с помощью любой из композиций для модификации растений в способах и композициях, описанных в данном документе.

Используемый в данном документ термин "растительная внеклеточная везикула", "растительная EV" или "EV" относится к замкнутой структуре из липидного бислоя, встречающейся в природе в растении. Необязательно, растительная EV содержит один

или несколько маркеров растительной EV. Используемый в данном документе термин "маркер растительной EV" относится к компоненту, который в естественных условиях ассоциирован с растением, такому как растительный белок, растительная нуклеиновая кислота, растительное низкомолекулярное соединение, растительный липид или их комбинации, в том числе без ограничения любому из маркеров растительной EV, перечисленных в приложении. В некоторых случаях маркер растительной EV представляет собой идентифицирующий маркер растительной EV, но не пестицидное средство. В некоторых случаях маркер растительной EV представляет собой идентифицирующий маркер растительной EV, а также пестицидное средство (например, либо ассоциирован с совокупностью PMP, или инкапсулирован в них, либо не непосредственно ассоциирован с совокупностью PMP или инкапсулирован в них).

Используемый в данном документе термин "пакет-мессенджер растений" или "PMP" относится к липидной структуре (например, липидному бислою, однослойной, многослойной структуре; например, везикулярной липидной структуре), диаметр которой составляет приблизительно 5-2000 нм (например, по меньшей мере 5-1000 нм, по меньшей мере 5-500 нм, по меньшей мере 400-500 нм, по меньшей мере 25-250 нм, по меньшей мере 50-150 нм или по меньшей мере 70-120 нм), которая получена из (например, обогащена, выделена или очищена из) растительного источника или его сегмента, части или экстракта, содержащей липидные компоненты или компоненты, отличные от липидов (например, пептиды, нуклеиновые кислоты или низкомолекулярные соединения), ассоциированные с ними, и которая была обогащена, выделена или очищена из растения, части растения или растительной клетки, при этом обогащение или выделение приводит к удалению одного или нескольких контаминантов или нежелательных компонентов из растения-источника. PMP могут представлять собой высокоочищенные препараты встречающихся в природе EV. Предпочтительно, из растения-источника удаляется по меньшей мере 1% контаминантов или нежелательных компонентов (например, по меньшей мере 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99%, или 100%), относящихся к одному или нескольким контаминантам или нежелательным компонентам растения-источника, например, компонентов клеточной стенки растения; пектина; растительных органелл (например, митохондрий; пластид, таких как хлоропласты, лейкопласты или амилопласты; и ядер); растительного хроматина (например, растительной хромосомы) или растительных молекулярных агрегатов (например, белковых агрегатов, агрегатов белок-нуклеиновая кислота, липопротеиновых агрегатов или липидопротеиновых структур). Предпочтительно, PMP является на по меньшей мере 30% чистым (например, по меньшей мере 40% чистым, по меньшей мере 50% чистым, по меньшей мере 60% чистым, по меньшей мере 70% чистым, по меньшей мере 80% чистым, по меньшей мере 90% чистым, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 100% чистым) относительно одного или нескольких контаминантов или нежелательных компонентами из растения-источника, как измерено по весу (вес/вес), спектральной визуализации (% пропускания) или

проводимости (См/м).

В некоторых случаях PMP представляет собой PMP из экстрагированных липидов (LPMP). Используемые в данном документе термины "PMP из экстрагированных липидов" и "LPMP" относятся к PMP, который был получен из липидной структуры (например, из липидного бислоя, однослойной, многослойной структуры; например, везикулярной липидной структуры), полученной из (например, обогащенной, выделенной или очищенной) растительного источника, где липидную структуру разрушают (например, разрушают путем экстракции липидов) и повторно собирают или восстанавливают в жидкой фазе (например, жидкой фазе, содержащей полезный груз) с использованием стандартных способов, например, восстанавливают посредством способа, предусматривающего гидратацию липидной пленки и/или введение растворителя, с получением LPMP, описанного в данном документе. При необходимости способ может дополнительно включать обработку ультразвуком, обработку замораживанием/оттаиванием и/или экструзию липидов, например, для уменьшения размера восстановленных PMP. PMP (например, LPMP) может содержать от 10% до 100% липидов, полученных из липидной структуры из растительного источника, например, может содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% липидов, полученных из липидной структуры из растительного источника. PMP (например, LPMP) может содержать все или часть липидных молекул, присутствующих в липидной структуре из растительного источника, например, он может содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или 100% липидных молекул, присутствующих в липидной структуре из растительного источника. PMP (например, LPMP) может не содержать, содержать часть или содержать все белковые молекулы, присутствующие в липидной структуре из растительного источника, например, может содержать 0%, менее 1%, менее 5%, менее 10%, менее 15%, менее 20%, менее 30%, менее 40%, менее 50%, менее 60%, менее 70%, менее 80%, менее 90%, менее 100% или 100% белковых молекул, присутствующих в липидной структуре из растительного источника. В некоторых случаях липидный бислой PMP (например, LPMP) не содержит белков. В некоторых случаях липидная структура PMP (например, LPMP) содержит сниженное количество белков по сравнению с липидной структурой из растительного источника.

PMP (например, LPMP) необязательно могут содержать экзогенные липиды, например, липиды, которые являются либо (1) экзогенными по отношению к растению (например, происходят из источника, который не является растением или частью растения, из которых получен PMP) (например, добавлены к PMP с использованием способов, описанных в данном документе), либо (2) эндогенными по отношению к растительной клетке или ткани, из которых получен PMP, но присутствуют в PMP

(например, добавлены к PMP с использованием способов, описанных в данном документе, подходов *in vitro или in vivo* генетической инженерии) при концентрации, которая превышает обнаруженную в природе (например, превышает концентрацию, обнаруженную во встречающейся в природе внеклеточной растительной везикуле). В липидный состав PMP может входить 0%, менее 1% или по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более 95% экзогенных липидов. Иллюстративные экзогенные липиды включают катионные липиды, ионизируемые липиды, цвиттер-ионные липиды и липидоиды.

PMP могут необязательно содержать дополнительные средства, такие как гетерологичные функциональные средства, например, средства, модифицирующие растения, пестицидные средства, удобрения, терапевтические средства, полинуклеотиды, полипептиды или низкомолекулярные соединения. PMP могут нести дополнительные средства (например, средства, модифицирующие растения) или могут быть ассоциированы с ними различными путями для обеспечения доставки средства в целевое растение, например, за счет инкапсулирования средства, включения средства в структуру из липидного бислоя или ассоциации средства (например, посредством конъюгирования) с поверхностью структуры из липидного бислоя. Гетерологичные функциональные средства могут быть включены в PMP либо in vivo (например, in planta), либо in vitro (например, в культуре ткани, в культуре клеток или включены синтетическим путем).

Используемый в данном документе термин "катионный липид" относится к амфифильной молекуле (например, липиду или липидоиду), содержащей катионную группу (например, катионную группу головки).

Используемый в данном документе термин "липидоид" относится к молекуле, обладающей одной или несколькими характеристиками липида.

Используемый в данном документе термин "средство, модифицирующее растение" относится к средству, которое может изменять генетические свойства (например, повышать экспрессию гена, понижать экспрессию гена или иным образом изменять нуклеотидную последовательность ДНК или РНК) или биохимические свойства растения таким образом, что это приводит к повышению приспособленности растения.

Используемый в данном документе термин "стабильная композиция на основе PMP" (например, композиция, содержащая загруженные или незагруженные PMP) относится к композиции на основе PMP, в которой за период времени (например, по меньшей мере 24 часов, по меньшей мере 48 часов, по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 60 дней или по меньшей мере 90 дней) сохраняется по меньшей мере 5% (например, по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100%) от исходного количества PMP (например, PMP на мл раствора) по сравнению с количеством PMP в композиции на основе PMP (например, во время получения или составления), необязательно при определенном диапазоне температур (например, при температуре,

составляющей по меньшей мере 24°C (например, по меньшей мере 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C или 30°C), по меньшей мере 20°C (например, по меньшей мере 20°C, 21°C, 22°C или 23°C), по меньшей мере 4°C (например, по меньшей мере 5°C, 10°C или 15°C), по меньшей мере -20°C (например, по меньшей мере -20°C, -15°C, -10°C, -5°C или 0°C) или -80°C (например, по меньшей мере -80°C, -70°C, -60°C, -50°C, -40°C или -30°C)); или она сохраняет по меньшей мере 5% (например, по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, или 100%) своей активности (например, пестицидной и/или репеллентной активности) по сравнению с исходной активностью PMP (например, во время получения или составления), необязательно при определенном диапазоне температур (например, при температуре, составляющей по меньшей мере 24°C (например, по меньшей мере 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C или 30°C), по меньшей мере 20°C (например, по меньшей мере 20°C, 21°C, 22°C или 23°C), по меньшей мере 4°C (например, по меньшей мере 5°C, 10°C или 15°C), по меньшей мере -20°C (например, по меньшей мере -20°C, -15°C, -10°C, -5°C или 0°C) или -80°C (например, по меньшей мере -80°C, -70°C, -60°C, -50°C, -40°C или -30°C)).

Используемый в данном документе термин "необработанный" относится к растению, которое не было приведено в контакт с композицией для модификации растений или в которое она не была доставлена, включая отдельное растение, в которое не была доставлена композиция для модификации растений, то же растение, подвергаемое воздействию, которое оценивали в момент времени до доставки композиции для модификации растений, или то же растение, подвергаемое воздействию, которое оценивали по необработанной части растения.

Используемый в данном документе термин "соковый мешочек" или "соковая везикула" относится к содержащему сок связанному с мембраной компоненту эндокарпия (плодолистика) гесперидия, например, плода цитрусовых. В некоторых аспектах соковые мешочки отделены от других частей плода, например, кожуры (экзокарпия или флаведо), внутренней кожуры (мезокарпия, альбедо или сердцевины), центрального столбика (плаценты), стенок сегментов или семян. В некоторых аспектах соковые мешочки представляют собой соковые мешочки грейпфрута, лимона, лайма или апельсина.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1A представляет собой схематическую диаграмму, на которой показан протокол получения PMP из грейпфрута с использованием стадии деструктивного отжима сока, включающей использование измельчителя, с последующими ультрацентрифугированием и очисткой в градиенте сахарозы. Включены изображения грейпфрутового сока после центрифугирования при 1000 x g в течение 10 мин и распределение полос градиента сахарозы после ультрацентрифугирования при 150000 x g в течение 2 часов.

Фиг. 1B представляет собой график распределения частиц PMP, измеренного с помощью Spectradyne NCS1.

Фиг. 2 представляет собой схематическую диаграмму, на которой показан протокол получения PMP из грейпфрута с использованием стадии мягкого отжима сока, включающей использование сетчатого фильтра, с последующим ультрацентрифугированием и очисткой в градиенте сахарозы. Включены изображения грейпфрутового сока после центрифугирования при 1000 x g в течение 10 мин и распределение полос градиента сахарозы после ультрацентрифугирования при 150000 x g в течение 2 часов.

Фиг. 3A представляет собой схематическую диаграмму, на которой показан протокол получения PMP из грейпфрута с использованием ультрацентрифугирования с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC) с выделением фракций, содержащих PMP. Фракции, элюированные в ходе SEC, анализируют в отношении концентрации частиц (NanoFCM), медианного размера частиц (NanoFCM) и концентрации белка (BCA).

Фиг. 3B представляет собой график, на котором показана концентрация частиц на мл в элюированных фракциях эксклюзионной хроматографии (SEC) (NanoFCM). Фракции, содержащие большую часть PMP ("фракция PMP"), отмечены стрелкой. PMP элюируются во фракциях 2-4.

Фиг. 3C представляет собой набор графиков и таблицу, в которых показан размер частиц в нм для выбранных фракций, полученных в ходе SEC, как измерено с использованием NanoFCM. На графиках показано распределение PMP по размеру во фракциях 1, 3, 5 и 8.

Фиг. 3D представляет собой график, на котором показана концентрация белка в мкг/мл во фракциях, полученных в ходе SEC, как измерено с помощью BCA-анализа. Помечена фракция, содержащая большую часть PMP ("фракция PMP"), а стрелка указывает на фракцию, содержащую контаминанты.

Фиг. 4A представляет собой схематическую диаграмму, на которой показан протокол для крупномасштабного получения PMP из 1 литра грейпфрутового сока (~7 грейпфрутов) с использованием соковыжималки с последующим дифференциальным центрифугированием для удаления крупного дебриса, 100x концентрирования сока с использованием TFF и эксклюзионной хроматографии (SEC) для выделения фракций, содержащих PMP. Фракции, элюированные в ходе SEC, анализируют в отношении концентрации частиц (NanoFCM), медианного размера частиц (NanoFCM) и концентрации белка (BCA).

Фиг. 4B представляет собой пару графиков, на которых показана концентрация белка (BCA-анализ, верхняя панель) и концентрация частиц (NanoFCM, нижняя панель) на объем элюата SEC (мл) из крупномасштабного исходного материала, представляющего собой 1000 мл грейпфрутового сока, где отмечено большое количество контаминантов в поздних объемах элюирования SEC.

Фиг. 4C представляет собой график, на котором показано, что инкубация фракции неочищенных PMP из грейпфрута с EDTA при конечной концентрации 50 мМ, pH 7,15, с последующим диализом на протяжении ночи с использованием мембраны с отсечением

300 кДа приводила к успешному удалению контаминантов, присутствующих во поздних фракциях, элюированных в ходе SEC, как показано по поглощению при 280 нм. Разница между используемыми для диализа буферами (PBS без кальция/магния pH 7,4, MES pH 6, Tris pH 8,6) отсутствовала.

Фиг. 4D представляет собой график, на котором показано, что инкубация фракции неочищенных PMP из грейпфрута с EDTA при конечной концентрации 50 мМ, pH 7,15, с последующим диализом на протяжении ночи с использованием мембраны с отсечением 300 кДа, приводила к успешному удалению контаминантов, присутствующих во фракциях позднего элюирования после SEC, как показано с помощью BCA-анализа белка, который, помимо выявления белка, чувствителен к присутствию сахаров и пектинов. Разница между используемыми для диализа буферами (PBS без кальция/магния pH 7,4, MES pH 6, Tris pH 8,6) отсутствовала.

Фиг. 5A представляет собой график, на котором показана концентрация частиц (частицы/мл) во фракциях из культуры растительных клеток BMS, элюированных в ходе SEC, как измерено с помощью нанопроточной цитометрии (NanoFCM). PMP элюировались во фракциях 4-6, полученных в ходе SEC.

Фиг. 5B представляет собой график, на котором показано поглощение при 280 нм (A.U.) во фракциях из BMS, элюированных в ходе SEC, измеренное на спектрофотометре SpectraMax®. PMP элюировались во фракциях 4-6; фракции 9-13 содержали контаминанты.

Фиг. 5C представляет собой график, на котором показана концентрация белка (мкг/мл) во фракциях из BMS, элюированных в ходе SEC, как определено с помощью BCA-анализа. PMP элюировались во фракциях 4-6; фракции 9-13 содержали контаминанты.

Фиг. 5D представляет собой диаграмму рассеяния, на которой показаны частицы в объединенных PMP-содержащих фракциях из BMS, элюированных в ходе SEC, как измерено с помощью нанопроточной цитометрии (NanoFCM). Концентрацию PMP (частицы/мл) определяли с использованием стандарта для гранулы в соответствии с инструкциями NanoFCM.

Фиг. 5E представляет собой график, на котором показано распределение PMP BMS по размеру (нм) для гейтированных частиц (с вычитанием фона), изображенных на фиг. 5D. Медианный размер PMP (нм) определяли с использованием стандартов для гранул Exo в соответствии с инструкциями NanoFCM.

Фиг. 6A представляет собой диаграмму рассеяния и график, на которых показаны размер частиц у AF488-меченных PMP из лимона, как измерено с помощью нанопроточной цитометрии (NanoFCM). Верхняя панель представляет собой диаграмму рассеяния, на которой показаны AF488-меченные PMP из лимона. Частицы гейтировали на основе сигнала флуоресценции FITC относительно немеченых частиц и фонового сигнала. Эффективность мечения составляла 89,4%, как определено по количеству флуоресцентных частиц относительно общего количества выявленных частиц. Конечную

концентрацию AF488-PMP ($2{,}91\times10^{12}$ PMP/мл) определяли по количеству флуоресцентных частиц и с использованием стандарта для гранул с известной концентрацией в соответствии с инструкциями NanoFCM. Нижняя панель представляет собой график распределения по размеру (нм) у 488-меченных PMP из лимона. Медианный размер PMP определяли с использованием стандартов для гранул Exo в соответствии с инструкциями NanoFCM. Медианный размер AF488-PMP из лимона составлял 79,4 нм +/- 14,7 нм (SD).

Фиг. 6B представляет собой набор микрофотографий, на которых показано поглощение PMP из лимона (LM), меченных с помощью Alexa Fluor® 488 (AF488), линиями растительных клеток Glycine max (соя), *Triticum aestivum* (пшеница) и культурой клеток BMS маиса. На панелях со светлопольными изображениями показано расположение клеток; на панелях, помеченных "GFP", показана флуоресценция AF488. На поглощение PMP клеткой указывает присутствие сигнала AF488 в клетке. Свободный AF488 ("свободный краситель") показан в качестве контроля.

Фиг. 7 представляет собой пару диаграмм и набор микрофотографий, на которых показано поглощение PMP из лимона (LM) и грейпфрута (GF), меченных с помощью DL800, проростками Arabidopsis thaliana и ростками люцерны. Показана интенсивность флуоресценции красителя DL800. Интенсивность флуоресценции измеряли через 22 hpt (часы после обработки) в случае проростков Arabidopsis thaliana и через 24 часа в случае ростков люцерны. Проростки, инкубированные без красителя ("отрицательный контроль") и со свободным красителем DL800 ("только краситель DL800"), показаны в качестве контролей.

Фиг. 8A представляет собой обзорное описание эксперимента по обработке ростков люцерны с помощью DyLight800nm-меченных PMP, которые были получены с обработкой пектиназой или без нее.

Фиг. 8B представляет собой инфракрасную тепловую карту, на которой показано поглощение очищенных PMP из лимона ростками люцерны, где показано, что обработка пектиназой во время получения PMP из лимона, с последующим мечением очищенных PMP с помощью DL800nm, не влияет на поглощение или транспорт PMP. Изображения в инфракрасном спектре получены на сканере Odyssey.

Фиг. 9A представляет собой пару микрофотографий, на которых показана флуоресценция красителя DiR при 750 нм в двухнедельных проростках Arabidopsis thaliana, которые либо не были обработаны (необработанные), либо были обработаны восстановленными из липидов PMP (LPMP) из лимона (LM), окрашенными DiR (LM-LPMP-DiR). Изображения были получены на флуоресцентном аппарате для визуализации iBright 1500.

Фиг. 9B представляет собой пару микрофотографий, на которых показана флуоресценция красителя DiR при 750 нм в двухнедельных проростках Arabidopsis thaliana, которые либо были обработаны контролем DiR, либо были обработаны LPMP грейпфрута (GF), окрашенными DiR (GF-LPMP-DiR). Изображения были получены на

флуоресцентном аппарате для визуализации iBright 1500.

Фиг. 10A представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показан анализ экспрессии гена FLOWERING WAGENINGEN (FWA) в сравнении с убиквитином (UBI), выполненный с помощью RT-qPCR, у растений dCas9-SunTag-VP64 Arabidopsis thaliana, обработанных в течение 48 ч с помощью LPMP, загруженных эквимолярным количеством FWA-gRNA 4 и 17 (LPMP sgRNA), и LPMP с добавленным DC-холестерином, загруженных эквимолярным количеством FWA-gRNA 4 и 17 (DC-Chol sgRNA). В качестве контролей представлены растения, обработанные эквивалентным количеством дуплексной смеси FWA-gRNA 4/17 (sgRNA4/17), и растения, обработанные LPMP с добавленным DC-холестерином, загруженными только tracrRNA (без gRNA) (DC-Chol tracrRNA). Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, однофакторный ANOVA с использованием апостериорного критерия Сидака.

Фиг. 10B представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показана кратная индукция FWA у растений dCas9-SunTag-VP64 Arabidopsis thaliana, обработанных в течение 48 ч с помощью LPMP, загруженных эквимолярным количеством FWA-gRNA 4 и 17 (LPMP sgRNA), и LPMP с добавленным DC-холестерином, загруженных эквимолярным количеством FWA-gRNA 4 и 17 (DC-Chol sgRNA), в сравнении с обработкой дуплексной смесью FWA-gRNA 4/17 (sgRNA4/17) в качестве контроля, как измерено с использованием анализа экспрессии гена, выполненного с помощью RT-qPCR. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, однофакторный ANOVA с использованием апостериорного критерия Сидака.

Фиг. 10C представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показана кратная индукции ATISOPENTENYL DIPHOSPHE ISOMERASE 2 (IPP2) у растений dCas9-SunTag-VP64 Arabidopsis thaliana, обработанных в течение 48 ч с помощью LPMP, загруженных эквимолярным количеством FWA-gRNA 4 и 17 (LPMP sgRNA), и LPMP с добавленным DC-холестерином, загруженных эквимолярным количеством FWA-gRNA 4 и 17 (DC-Chol sgRNA), в сравнении с обработкой дуплексной смесью FWA-gRNA 4/17 (sgRNA4/17) в качестве контроля, как измеренную с использованием анализа экспрессии гена, выполненного с помощью RT-qPCR, Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, однофакторный ANOVA с использованием апостериорного критерия Сидака.

Фиг. 11 представляет собой схематическую диаграмму, на которой показан технологический процесс получения восстановленных из липидов PMP (LPMP) на основе PMP из грейпфрута и лимона.

Фиг. 12 представляет собой график, на котором показана относительная частота частиц заданного размера (нм) у LPMP; LPMP с добавленным DC-холестерином (DC-Chol) и LPMP с добавленным DOTAP (DOTAP). Данные получены посредством NanoFCM с использованием стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем.

Фиг. 13A представляет собой график, на котором показан дзета-потенциал (мВ) LPMP, не содержащих добавленные липиды (LPMP), и LPMP, содержащих 25% или 40%

DOTAP или DC-холестерина, как измерено с использованием динамического светорассеяния (DLS). Данные представлены как среднее значение ± SD.

Фиг. 13B представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показан процент ввода Alexa Fluor 555-меченной siRNA, которую извлекали из LPMP после загрузки LPMP из липидов грейпфрута, не содержащих добавленные липиды (LPMP), и LPMP из липидов грейпфрута, содержащих 20% DOTAP.

Фиг. 13C представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показан процент ввода ATTO-меченной tracrRNA, которую извлекали из LPMP после загрузки LPMP из липидов лимона, не содержащих добавленные липиды (LPMP), и LPMP из липидов лимона, содержащих 40% DC-холестерина (DC-Chol).

Фиг. 13D представляет собой столбчатую диаграмму, на которой показана концентрация (мкг/мл) TracrRNA в LPMP, содержащих 40% DC-холестерина, которые не подвергали обработке или подвергали лизису с использованием Triton-X100 и гепарина (+TX+гепарин), как измерено с использованием анализа Quant-iT^{TM} RiboGreen®.

Фиг. 14A представляет собой микрофотографию, полученную посредством криоэлектронной микроскопии, на которой показаны LPMP, восстановленные из экстрагированных липидов лимона. Масштабная метка: 500 нм.

Фиг. 14B представляет собой график, на котором показана относительная частота частиц заданного эквивалентного сферического диаметра (нм) в LPMP, восстановленных из экстрагированных липидов лимона, как измерено с использованием криоэлектронной микроскопии.

Фиг. 15 представляет собой набор микрофотографий, на которых показаны фазово-контрастное изображение (левый столбец), флуоресценция ATTO 550 (центральный столбец) и совмещенные изображения клеток маиса Black Mexican Sweet (BMS), обработанных с помощью LPMP, не содержащих добавленные липиды (центральный ряд), и LPMP, содержащих 40% DC-холестерина (DC-Chol). Клетки, которые обработали только H_2O, представлены в качестве отрицательного контроля (верхние панели). Поглощение клеткой LPMP или LPMP, модифицированных с помощью DC-холестерина, определяют по наличию сигнала TracrRNA ATTO 550 в клетке. Масштабная метка: 100 мкм.

Подробное описание

В данном документе предусмотрены композиции и связанные способы модификации растений (например, повышения приспособленности растения) с применением композиций для модификации растений, которые содержат пакеты-мессенджеры растений (PMP), упорядоченные структуры из липидов, полученные полностью или частично из растительных внеклеточных везикул (EV) или их сегментов, частей или экстрактов. PMP, представленные в данном документе, содержат средства, модифицирующие растения. Также включены составы для модификации растений, в которых PMP представлены в практически чистой форме или концентрированных формах. Композиции и составы для модификации растений, описанные в данном

документе, могут быть доставлены непосредственно в растение для модификации растений с помощью способа, при котором требуемые свойства растения (например, для увеличения приспособленности растения) вводятся в растение, такое как сельскохозяйственное или садовое растение.

I. Композиции для модификации растений

Композиции для модификации растений, описанные в данном документе, содержат совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP). PMP представляет собой липидную структуру (например, липидный бислой, однослойную или многослойную структуру), которая содержит растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт (например, липидный экстракт). Растительные EV относятся к замкнутой структуре из липидного бислоя, которая встречается в естественных условиях в растении и имеет диаметр приблизительно 5-2000 нм. Растительные EV могут происходить из различных биогенетических путей растений. В природе растительные EV могут быть обнаружены во внутриклеточных и внеклеточных компартментах растений, таких как растительный апопласт, компартмент, расположенный снаружи цитоплазматической мембраны и образованный единой системой клеточных стенок и внеклеточным пространством. В качестве альтернативы PMP могут представлять собой обогащенные растительные EV, обнаруженные в средах для культивирования при секреции из растительных клеток. С помощью целого ряда способов, дополнительно описанных в данном документе, растительные EV могут быть выделены из растений (например, из апопластной жидкости), за счет чего получают PMP. PMP в данном документе дополнительно содержат гетерологичное средство, модифицирующее растения, которое может быть введено с использованием различных способов *in vivo или in vitro*, таких как способы, дополнительно описанные в данном документе.

PMP могут содержать растительные EV или их сегменты, части или экстракты. Необязательно PMP также могут содержать экзогенные липиды в дополнение к липидам, полученным из растительных EV. В некоторых вариантах осуществления диаметр растительных EV составляет приблизительно 5-2000 нм. Например, PMP может содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средний диаметр которых составляет приблизительно 5-50 нм, приблизительно 50-100 нм, приблизительно 100-150 нм, приблизительно 150-200 нм, приблизительно 200-250 нм, приблизительно 250-300 нм, приблизительно 300-350 нм, приблизительно 350-400 нм, приблизительно 400-450 нм, приблизительно 450-500 нм, приблизительно 500-550 нм, приблизительно 550-600 нм, приблизительно 600-650 нм, приблизительно 650-700 нм, приблизительно 700-750 нм, приблизительно 750-800 нм, приблизительно 800-850 нм, приблизительно 850-900 нм, приблизительно 900-950 нм, приблизительно 950-1000 нм, приблизительно 1000-1250 нм, приблизительно 1250-1500 нм, приблизительно 1500-1750 нм или приблизительно 1750-2000 нм. В некоторых случаях PMP содержит растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средний диаметр которых составляет приблизительно 5-950 нм, приблизительно 5-900 нм, приблизительно 5-850 нм, приблизительно 5-800 нм, приблизительно 5-750 нм,

приблизительно 5-700 нм, приблизительно 5-650 нм, приблизительно 5-600 нм, приблизительно 5-550 нм, приблизительно 5-500 нм, приблизительно 5-450 нм, приблизительно 5-400 нм, приблизительно 5-350 нм, приблизительно 5-300 нм, приблизительно 5-250 нм, приблизительно 5-200 нм, приблизительно 5-150 нм, приблизительно 5-100 нм, приблизительно 5-50 нм или приблизительно 5-25 нм. В определенных случаях средний диаметр растительной EV или ее сегмента, части или экстракта составляет приблизительно 50-200 нм. В определенных случаях средний диаметр растительной EV или ее сегмента, части или экстракта составляет приблизительно 50-300 нм. В определенных случаях средний диаметр растительной EV или ее сегмента, части или экстракта составляет приблизительно 200-500 нм. В определенных случаях средний диаметр растительной EV или ее сегмента, части или экстракта составляет приблизительно 30-150 нм.

В некоторых случаях PMP может содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средний диаметр которых составляет по меньшей мере 5 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 150 нм, по меньшей мере 200 нм, по меньшей мере 250 нм, по меньшей мере 300 нм, по меньшей мере 350 нм, по меньшей мере 400 нм, по меньшей мере 450 нм, по меньшей мере 500 нм, по меньшей мере 550 нм, по меньшей мере 600 нм, по меньшей мере 650 нм, по меньшей мере 700 нм, по меньшей мере 750 нм, по меньшей мере 800 нм, по меньшей мере 850 нм, по меньшей мере 900 нм, по меньшей мере 950 нм или по меньшей мере 1000 нм. В некоторых случаях PMP содержит растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средний диаметр которых составляет менее 1000 нм, менее 950 нм, менее 900 нм, менее 850 нм, менее 800 нм, менее 750 нм, менее 700 нм, менее 650 нм, менее 600 нм, менее 550 нм, менее 500 нм, менее 450 нм, менее 400 нм, менее 350 нм, менее 300 нм, менее 250 нм, менее 200 нм, менее 150 нм, менее 100 нм или менее 50 нм. Для измерения диаметра частицы растительной EV или ее сегмента, части или экстракта можно использовать различные способы (например, способ динамического светорассеяния), стандартные в данной области техники.

В некоторых случаях PMP может содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средняя площадь поверхности которых составляет от 77 $нм^2$ до $3,2\times10^6$ $нм^2$ (например, 77-100 $нм^2$, 100-1000 $нм^2$, 1000-1×10^4 $нм^2$, 1×104-1×10^5 $нм^2$, 1×10^5-1×10^6 $нм^2$ или 1×10^6 -$3,2\times10^6$ $нм^2$). В некоторых случаях PMP может содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средний объем которых составляет от 65 $нм^3$ до $5,3\times10^8$ $нм^3$ (например, 65-100 $нм^3$, 100-1000 $нм^3$, 1000-1×10^4 $нм^3$, 1×104-1×10^5 $нм^3$, 1×105-1×10^6 $нм^3$, 1×10^6 -1×10^7 $нм^3$, 1×107-1×10^8 $нм^3$, 1×108-$5,3\times10^8$ $нм^3$). В некоторых случаях PMP может содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, средняя площадь поверхности которых составляет по меньшей мере 77 $нм^2$, (например, по меньшей мере 77 $нм^2$, по меньшей мере 100 $нм^2$, по меньшей мере 1000 $нм^2$, по меньшей мере 1×10^4 $нм^2$, по меньшей мере 1×10^5 $нм^2$, по меньшей мере 1×10^6 $нм^2$ или по меньшей мере 2×10^6 $нм^2$). В некоторых случаях PMP может содержать растительную

EV или ее сегмент, часть или экстракт, средний объем которых составляет по меньшей мере 65 $нм^3$ (например, по меньшей мере 65 $нм^3$, по меньшей мере 100 $нм^3$, по меньшей мере 1000 $нм^3$, по меньшей мере 1×10^4 $нм^3$, по меньшей мере 1×10^5 $нм^3$, по меньшей мере 1×10^6 $нм^3$, по меньшей мере 1×10^7 $нм^3$, по меньшей мере 1×10^8 $нм^3$, по меньшей мере 2×10^8 $нм^3$, по меньшей мере 3×10^8 $нм^3$, по меньшей мере 4×10^8 $нм^3$ или по меньшей мере 5×10^8 $нм^3$.

В некоторых случаях размет PMP может быть таким же, как у растительной EV или ее сегмента, экстракта или часть. В качестве альтернативы размер PMP может быть отличным от размера исходной растительной EV, из которой получен PMP. Например, диаметр PMP может составлять приблизительно 5-2000 нм. Например, средний диаметр PMP может составлять приблизительно 5-50 нм, приблизительно 50-100 нм, приблизительно 100-150 нм, приблизительно 150-200 нм, приблизительно 200-250 нм, приблизительно 250-300 нм, приблизительно 300-350 нм, приблизительно 350-400 нм, приблизительно 400-450 нм, приблизительно 450-500 нм, приблизительно 500-550 нм, приблизительно 550-600 нм, приблизительно 600-650 нм, приблизительно 650-700 нм, приблизительно 700-750 нм, приблизительно 750-800 нм, приблизительно 800-850 нм, приблизительно 850-900 нм, приблизительно 900-950 нм, приблизительно 950-1000 нм, приблизительно 1000-1200 нм, приблизительно 1200-1400 нм, приблизительно 1400-1600 нм, приблизительно 1600-1800 нм или приблизительно 1800-2000 нм. В некоторых случаях средний диаметр PMP может составлять по меньшей мере 5 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 150 нм, по меньшей мере 200 нм, по меньшей мере 250 нм, по меньшей мере 300 нм, по меньшей мере 350 нм, по меньшей мере 400 нм, по меньшей мере 450 нм, по меньшей мере 500 нм, по меньшей мере 550 нм, по меньшей мере 600 нм, по меньшей мере 650 нм, по меньшей мере 700 нм, по меньшей мере 750 нм, по меньшей мере 800 нм, по меньшей мере 850 нм, по меньшей мере 900 нм, по меньшей мере 950 нм, по меньшей мере 1000 нм, по меньшей мере 1200 нм, по меньшей мере 1400 нм, по меньшей мере 1600 нм, по меньшей мере 1800 нм или приблизительно 2000 нм. Для измерения диаметра частиц PMP можно использовать различные способы (например, способ динамического светорассеяния), стандартные в данной области техники. В некоторых случаях размер PMP определяют после загрузки гетерологичных средств, модифицирующих растения, или после других модификаций PMP.

В некоторых случаях средняя площадь поверхности PMP может составлять от 77 $нм^2$ до $1,3\times10^7$ $нм^2$ (например, 77-100 $нм^2$, 100-1000 $нм^2$, 1000-1×10^4 $нм^2$, 1×104-1×10^5 $нм^2$, 1×105-1×10^6 $нм^2$ или 1×10^6-$1,3\times10^7$ $нм^2$). В некоторых случаях средний объем PMP может составлять от 65 $нм^3$ до 4,2 x10^9 $нм^3$ (например, 65-100 $нм^3$, 100-1000 $нм^3$, 1000-1×10^4 $нм^3$, 1×104-1×10^5 $нм^3$, 1×105-1×10^6 $нм^3$, 1×106-1×10^7 $нм^3$, 1×107-1×10^8 $нм^3$, 1×108-1×10^9 $нм^3$ или 1×109-$4,2\times10^9$ $нм^3$). В некоторых случаях средняя площадь поверхности PMP составляет по меньшей мере 77 $нм^2$ (например, по меньшей мере 77 $нм^2$, по меньшей мере 100 $нм^2$, по меньшей мере 1000 $нм^2$, по меньшей мере 1×10^4 $нм^2$, по меньшей мере 1×10^5

$нм^2$, по меньшей мере 1×10^6 $нм^2$ или по меньшей мере 1×10^7 $нм^2$). В некоторых случаях средний объем PMP составляет по меньшей мере 65 $нм^3$ (например, по меньшей мере 65 $нм^3$, по меньшей мере 100 $нм^3$, по меньшей мере 1000 $нм^3$, по меньшей мере 1×10^4 $нм^3$, по меньшей мере 1×10^5 $нм^3$, по меньшей мере 1×10^6 $нм^3$, по меньшей мере 1×10^7 $нм^3$, по меньшей мере 1×10^8 $нм^3$, по меньшей мере 1×10^9 $нм^3$, по меньшей мере 2×10^9 $нм^3$, по меньшей мере 3×10^9 $нм^3$ или по меньшей мере 4×10^9 $нм^3$).

В некоторых случаях PMP может содержать интактную растительную EV. В качестве альтернативы PMP может содержать сегмент, часть или экстракт с полной площадью поверхности везикулы (например, сегмент, часть или экстракт, содержащие менее 100% (например, менее 90%, менее 80%, менее более 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 10%, менее 5% или менее 1%) от полной площади поверхности везикулы) растительной EV. Сегмент, часть или экстракт могут иметь любую форму, такую как круговой сегмент, сферический сегмент (например, полусфера), криволинейный сегмент, линейный сегмент или плоский сегмент. В случаях, когда сегмент представляет собой сферический сегмент везикулы, сферический сегмент может представлять собой сегмент, который образуется в результате расщепления сферической везикулы вдоль пары параллельных линий, или сегмент, который возникает в результате расщепления сферической везикулы вдоль пары непараллельных линий. Соответственно, совокупность PMP может содержать совокупность интактных растительных EV, совокупность сегментов, частей или экстрактов растительных EV или смесь интактных растительных EV и их сегментов. Специалисту в данной области техники будет понятно, что соотношение интактных и подвергнутых сегментации растительных EV будет зависеть от конкретного применяемого способа выделения. Например, измельчение или гомогенизация растения или его части могут приводить к образованию PMP, которые содержат более высокий процент сегментов, частей или экстрактов растительных EV, чем в случае недеструктивного способа экстракции, таком как вакуумная инфильтрация.

В случаях, когда PMP содержит сегмент, часть или экстракт растительной EV, средняя площадь поверхности сегмента, части или экстракта EV может быть меньше, чем у интактной везикулы, например, средняя площадь поверхности составляет менее 77 $нм^2$, 100 $нм^2$, 1000 $нм^2$, 1×10^4 $нм^2$, 1×10^5 $нм^2$, 1×10^6 $нм^2$ или $3{,}2\times10^6$ $нм^2$). В некоторых случаях площадь поверхности сегмента, части или экстракта EV составляет менее 70 $нм^2$, 60 $нм^2$, 50 $нм^2$, 40 $нм^2$, 30 $нм^2$, 20 $нм^2$ или 10 $нм^2$). В некоторых случаях PMP может содержать сегмент, часть или экстракт растительной EV, средний объем которых меньше, чем у интактной везикулы, например, средний объем составляет менее 65 $нм^3$, 100 $нм^3$, 1000 $нм^3$, 1×10^4 $нм^3$, 1×10^5 $нм^3$, 1×10^6 $нм^3$, 1×10^7 $нм^3$, 1×10^8 $нм^3$ или $5{,}3\times10^8$ $нм^3$).

В случаях, когда PMP содержит экстракт растительной EV, например, в случаях, когда PMP содержит липиды, экстрагированные (например, с помощью хлороформа) из растительной EV, PMP может содержать по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более 99% липидов, экстрагированных

(например, с помощью хлороформа) из растительной EV. PMP в совокупности могут содержать сегменты растительной EV и/или липиды, экстрагированные из растительной EV, или их смесь.

Далее в данном документе описаны подробности, касающиеся способов получения PMP, маркеров растительной EV, которые могут быть ассоциированы с PMP, и составов для композиций, содержащих PMP.

A. Способы получения

PMP можно получать из растительных EV или их сегментов, частей или экстрактов (например, липидного экстракта), которые в естественных условиях встречаются в растениях или их частях, включая растительные ткани или растительные клетки. Иллюстративный способ получения PMP включает (a) получение исходного образца из растения или его части, где растение или его часть содержат EV; и (b) выделение фракции неочищенных PMP из исходного образца, где фракция неочищенных PMP характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце. Способ может дополнительно включать дополнительную стадию (c), предусматривающую очистку фракции неочищенных PMP, за счет чего получают совокупности чистых PMP, где совокупность чистых PMP характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV. Каждый этап получения более подробно обсуждается ниже. Иллюстративные способы, относящиеся к выделению и очистке PMP, можно найти, например, в Rutter and Innes, Plant Physiol. 173(1): 728-741, 2017; Rutter et al, Bio. Protoc. 7(17): e2533, 2017; Regente et al, J of Exp. Biol. 68(20): 5485-5496, 2017; Mu et al, Mol. Nutr. Food Res., 58, 1561-1573, 2014 и Regente et al, FEBS Letters. 583: 3363-3366, 2009, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

В некоторых случаях совокупность PMP может быть выделена из растения посредством способа, который предусматривает стадии: (a) получения исходного образца из растения или его части, где растение или его часть содержат EV; (b) выделения фракции неочищенных PMP из исходного образца, где фракция неочищенных PMP характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце (например, уровнем, который понижен на по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99%, или 100%); и (c) очистки фракции неочищенных PMP, за счет чего получают совокупность чистых PMP, где совокупность чистых PMP характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV (например, уровнем, который понижен на по меньшей мере 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99%, или 100%).

PMP, представленные в данном документе, могут содержать растительную EV или ее сегмент, часть или экстракт, полученные из различных растений. PMP могут быть получены из растений любых родов (сосудистых или бессосудистых), включая без ограничения покрытосеменные (однодольные и двудольные растения), голосеменные, папоротники, плаунки, хвощи, псилофиты, плауновидные, водоросли (например, одноклеточные или многоклеточные, например, архепластидовые) или мхи. В определенных случаях PMP могут быть получены с использованием сосудистого растения, например, однодольных или двудольных, или голосеменных. Например, PMP могут быть получены с использованием люцерны, яблони, растения рода Arabidopsis, банана, ячменя, канолы, клещевины, цикория, хризантемы, клевера, какао, кофе, хлопчатника, семени хлопчатника, кукурузы, крамбе, клюквы, огурца, дендробиума, диоскореи, эвкалипта, овсяницы, льна, гладиолуса, растения семейства Лилейные, семени льна, проса, дыни, горчицы, овса, масличной пальмы, масличного рапса, папайи, арахиса, ананаса, декоративных растений, фасоли, картофеля, рапса, риса, ржи, райграса, сафлора, кунжута, сорго, сои, сахарной свеклы, сахарного тростника, подсолнечника, клубники, табака, томата, газонной травы, пшеницы или овощных культур, таких как салат, сельдерей, брокколи, цветная капуста, тыквенные культуры; плодовых и ореховых деревьев, таких как яблоня, груша, персик, апельсин, грейпфрут, лимон, лайм, миндаль, пекан, грецкий орех, лещина; вьющихся растений, таких как виноград, киви, хмель; плодовых кустарников и колючих кустарников, таких как малина, ежевика, крыжовник; лесных деревьев, таких как ясень, сосна, пихта, клен, дуб, каштан, тополь; с использованием люцерны, канолы, клещевины, кукурузы, хлопчатника, крамбе, льна, семени льна, горчицы, масличной пальмы, масличного рапса, арахиса, картофеля, риса, сафлора, кунжута, сои, сахарной свеклы, подсолнечника, табака, томата или пшеницы.

PMP могут быть получены с использованием целого растения (например, целых розеток или проростков) или в качестве альтернативы из одной или нескольких частей растения (например, листа, семени, корня, плода, вегетативной части, пыльцы, флоэмного сока или ксилемного сока). Например, PMP могут быть получены с использованием вегетативных органов/структур побега (например, листьев, стеблей или клубней), корней, цветков и органов/структур цветка (например, пыльцы, прицветников, чашелистиков, лепестков, тычинок, плодолистиков, пыльников или семяпочек), семени (включая зародыш, эндосперм или семенную кожуру), плода (зрелой завязи), сока (например, флоэмного или ксилемного сока), растительной ткани (например, сосудистой ткани, основной паренхимы, опухолевой ткани и т. п.) и клеток (например, отдельных клеток, протопластов, зародышей, каллюсной ткани, замыкающих клеток, яйцеклеток и т. п.) или их потомства. Например, стадия выделения может включать (a) получение растения или его части, где часть растения представляет собой лист растения рода Arabidopsis. Растение может находиться на любой стадии развития. Например, PMP можно получать с использованием проростков, например, проростков возрастом 1 неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель или 8 недель (например, проростков

растения рода Arabidopsis). Другие иллюстративные PMP могут включать PMP, полученные с использованием корней (например, корней имбиря), фруктового сока (например, грейпфрутового сока), овощей (например, брокколи), пыльцы (например, пыльцы оливкового дерева), флоэмного сока (например, флоэмного сока растения рода Arabidopsis) или ксилемного сока (например, ксилемного сока растения томата).

PMP могут быть получены с использованием растения или его части посредством различных способов. Любой способ, который позволяет высвобождать апопластную фракцию растения, содержащую EV, или иную внеклеточную фракцию, которая содержит PMP, содержащие секретируемые EV (например, среды для культивирования), является подходящим в способах по настоящему изобретению. EV можно отделять от растения или части растения с помощью деструктивных (например, измельчения или гомогенизации растения или любой части растения) или недеструктивных (промывка или вакуумная инфильтрация растения или любой части растения) способов. Например, растение или его часть могут быть подвергнуты вакуумной инфильтрации, гомогенизации, измельчению или их комбинации для выделения EV из растения или части растения, за счет чего получают PMP. Например, стадия выделения может включать (b) выделение фракции неочищенных PMP из исходного образца (например, растения, части растения или образца, полученного из растения или части растения), где фракция неочищенных PMP характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце; где стадия выделения включает вакуумную инфильтрацию растения (например, с использованием буфера для выделения везикул) для высвобождения и сбора апопластной фракции. В качестве альтернативы стадия выделения может включать измельчение или гомогенизацию растения с высвобождением растительных EV, за счет чего получают PMP.

После выделения растительных EV, за счет чего получают PMP, PMP можно отделять или собирать во фракции неочищенных PMP (например, апопластной фракции). Например, стадия отделения может включать отделение совокупности PMP во фракцию неочищенных PMP с использованием центрифугирования (например, дифференциального центрифугирования или ультрацентрифугирования) и/или фильтрации для отделения фракции, содержащей PMP растения, от крупных контаминантов, включая дебрис растительных тканей, растительных клеток или органелл растительных клеток (например, ядер или хлоропластов). По этой причине фракция неочищенных PMP будет характеризоваться пониженным количеством крупных контаминантов, включая дебрис растительных тканей или растительные клетки, по сравнению с исходным образцом из растения-источника или части растения-источника. В зависимости от используемого способа фракция неочищенных PMP может дополнительно содержать пониженный уровень органелл растительной клетки (например, ядер, митохондрий или хлоропластов) по сравнению с исходным образцом из растения-источника или части растения-источника.

В некоторых случаях стадия выделения может включать отделение совокупности

PMP во фракцию неочищенных PMP с использованием центрифугирования (например, дифференциального центрифугирования или ультрацентрифугирования) и/или фильтрации для отделения фракции, содержащей растительные EV, от растительных клеток или клеточного дебриса. В таких случаях фракция неочищенных PMP будет характеризоваться пониженным количеством растительных клеток или клеточного дебриса по сравнению с исходным образцом из растения-источника или части растения-источника.

Неочищенная фракция PMP может быть дополнительно очищена с помощью дополнительных способов очистки для получения совокупности чистых PMP. Например, фракция неочищенных PMP может быть отделена от других растительных компонентов с помощью ультрацентрифугирования, например, с использованием градиента плотности (йодиксанола или сахарозы), и/или использования других подходов для удаления агрегированных компонентов (например, осаждения или эксклюзионной хроматографии). Полученные чистые PMP могут характеризоваться пониженным уровнем контаминантов или нежелательных компонентов из растения-источника (например, одного или нескольких компонентов, отличных от PMP, таких как белковые агрегаты, агрегаты нуклеиновых кислот, агрегаты белок-нуклеиновая кислота, свободные липопротеины, липидопротеиновые структуры, ядра, компоненты клеточной стенки, клеточные органеллы или их комбинация) по сравнению с одной или несколькими фракциями, полученными во время более ранних стадий отделения, или по сравнению с предварительно установленным пороговым уровнем, например, спецификацией для коммерческого выпуска. Например, чистые PMP могут характеризоваться пониженным уровнем (например, пониженным на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более чем 100%; или в приблизительно 2 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 25 раз, 50 раз, 75 раз, 100 раз или более чем 100 раз) растительных органелл или компонентов клеточной стенки по сравнению с уровнем в исходном образце. В некоторых случаях чистые PMP практически не содержат (например, характеризуются невыявляемыми уровнями) одного или нескольких компонентов, отличных от PMP, таких как белковые агрегаты, агрегаты нуклеиновых кислот, агрегаты белок-нуклеиновая кислота, свободные липопротеины, липидопротеиновые структуры, ядра, компоненты клеточной стенки, клеточные органеллы или их комбинации. Дополнительные примеры стадий высвобождения и отделения можно найти в примере 1. Концентрация PMP может составлять, например, 1×10^{9}, 5×10^{9}, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×1011, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13} или более 1×10^{13} PMP/мл.

Например, из PMP могут быть удалены белковые агрегаты. Например, PMP могут быть получены в диапазоне значений pH (например, как измерено с использованием pH-зонда) для осаждения белковых агрегатов в раствор. Например, значение pH может доводиться до pH 3, pH 5, pH 7, pH 9 или pH 11 посредством добавления, например, гидроксида натрия или хлористоводородной кислоты. Как только раствор достигнет

указанного значения pH, его можно фильтровать для удаления твердых частиц. В качестве альтернативы PMP можно подвергать флокуляции с использованием добавления заряженных полимеров, таких как Polymin-P или Praestol 2640. Вкратце, к раствору добавляют Polymin-P или Praestol 2640 и перемешивают с помощью лопастной мешалки. Затем раствор можно фильтровать для удаления твердых частиц. В качестве альтернативы агрегаты можно солюбилизировать посредством повышения концентрации соли. Например, к PMP можно добавлять NaCl до тех пор, пока его концентрация не составит, например, 1 моль/л. Затем раствор можно фильтровать для выделения PMP. В качестве альтернативы агрегаты солюбилизируют посредством повышения температуры. Например, PMP можно нагревать при перемешивании до тех пор, пока раствор не достигнет однородной температуры, например 50°C, в течение 5 минут. Затем смесь PMP можно фильтровать для выделения PMP. В качестве альтернативы растворимые контаминанты можно отделять из растворов PMP с помощью колонки для эксклюзионной хроматографии в соответствии со стандартными процедурами, где PMP элюируются в первых фракциях, в то время как белки и рибонуклеопротеины, а также некоторые липопротеины элюируются позже. Эффективность удаления белковых агрегатов можно определять путем измерения и сравнения концентрации белка до и после удаления белковых агрегатов посредством количественного определения белка с помощью BCA/метода Бредфорда.

Любой из способов получения, описанных в данном документе, может быть дополнен любыми количественными или качественными способами, известными из уровня техники, чтобы определять характеристики или идентифицировать PMP на любой стадии способа получения. PMP могут быть охарактеризованы с помощью различных способов анализа для оценки выхода PMP, концентрации PMP, чистоты PMP, состава PMP или размеров PMP. PMP можно оценивать с помощью ряда способов, известных из уровня техники, которые делают возможной визуализацию, определение количества или качественных характеристик (например, идентификацию состава) PMP, таких как микроскопия (например, трансмиссионная электронная микроскопия), динамическое светорассеяние, отслеживание наночастиц, спектроскопия (например, инфракрасный анализ с преобразованием Фурье) или масс-спектрометрия (анализ белков и липидов). В определенных случаях способы (например, масс-спектроскопия) можно применять для идентификации маркеров растительных EV, присутствующих на PMP, таких как маркеры, раскрытые в приложении. Чтобы облегчить анализ и определение характеристик фракции PMP, PMP могут быть дополнительно помечены или окрашены. Например, PMP могут быть окрашены с помощью йодида 3,3'-дигексилоксакарбоцианина ($DIOC_6$), флуоресцентного липофильного красителя, PKH67 (Sigma Aldrich); Alexa Fluor® 488 (Thermo Fisher Scientific) или DyLight™ 800 (Thermo Fisher). За неимением сложных форм отслеживания наночастиц этот относительно простой подход позволяет количественно оценить общее содержание мембран и может применяться для опосредованного измерения концентрации PMP (Rutter and Innes, Plant Physiol. 173(1): 728-741, 2017; Rutter

et al, Bio. Protoc. 7(17): e2533, 2017). Для более точных измерений и для оценки распределения PMP по размеру можно использовать отслеживание наночастиц.

В ходе способа получения PMP необязательно могут быть получены таким образом, что PMP находятся при повышенной концентрации (например, на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100%; или в приблизительно 2 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 25 раз, 50 раз, 75 раз, 100 раз или более 100 раз) по сравнению с уровнем EV в контрольном или исходном образце. PMP могут составлять от приблизительно 0,1% до приблизительно 100% композиции для модификации растений, как, например, любую величину от приблизительно 0,01% до приблизительно 100%, от приблизительно 1% до приблизительно 99,9%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 10%, от приблизительно 1% до приблизительно 25%, от приблизительно 10% до приблизительно 50% или от приблизительно 50% до приблизительно 99%. В некоторых случаях композиция содержит по меньшей мере любое количество из 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше PMP, например, как измерено в единицах вес/объем, по процентному содержанию белков PMP в композиции и/или процентному содержанию липидов в композиции ((например, при измерения флуоресцентно меченых липидов); см., например, пример 3). В некоторых случаях концентрированные средства используются в качестве концентрированных коммерческих продуктов, например, конечный потребитель может разбавить коммерческий продукт, который при этом будет иметь значительно более низкую концентрацию активного ингредиента. В некоторых вариантах осуществления композицию составляют в виде состава-концентрата для модификации растений, например, состава-концентрата сверхмалого объема.

Как проиллюстрировано в примере 1, PMP могут быть получены с использованием различных растений или их частей (например, апопласта листа, апопласта семени, корня, плода, вегетативной части, пыльцы, флоэмного или ксилемного сока). Например, PMP могут быть выделены из апопластной фракции растения, такой как апопласт листа (например, апопласт листьев Arabidopsis thaliana) или апопласт семян (например, апопласт семян подсолнечника). Другие иллюстративные PMP получают с использованием корней (например, корней имбиря), фруктового сока (например, грейпфрутового сока), овощей (например, брокколи), пыльцы (например, пыльцы оливкового дерева), флоэмного сока (например, флоэмного сока растения рода Arabidopsis), ксилемного сока (например, ксилемного сока растения томата) или супернатанта культуры клеток (например, супернатанта культуры клеток табака BY2). В этом примере дополнительно продемонстрировано получение PMP из этих различных растительных источников.

Как проиллюстрировано в примере 2, PMP можно очищать различными способами, например, с использованием градиента плотности (йодиксанола или сахарозы) в сочетании с ультрацентрифугированием и/или способами удаления агрегированных

контаминантов, например, осаждением или эксклюзионной хроматографией. Например, в примере 2 проиллюстрирована очистка PMP, которые были получены посредством стадий отделения, описанных в примере 1. Кроме того, PMP можно охарактеризовать в соответствии со способами, проиллюстрированными в примере 3.

В некоторых случаях PMP из композиций и способов по настоящему изобретению можно получить из растения или его части и использовать без дальнейшей модификации в PMP. В других случаях PMP может быть модифицирован перед использованием, как дополнительно описано в данном документе.

B. Маркеры растительных EV

PMP из композиций и способов по настоящему изобретению могут содержать ряд маркеров, которые идентифицируют PMP как полученные с использованием растительной EV и/или содержащего ее сегмент, часть или экстракт. Используемый в данном документе термин "маркер растительной EV" относится к компоненту, который естественным образом ассоциирован с растением и включен в EV или находится на ее поверхности in planta, такому как растительный белок, растительная нуклеиновая кислота, растительное низкомолекулярное соединение, растительный липид или их комбинация. Примеры маркеров растительных EV можно найти, например, в Rutter and Innes, Plant Physiol. 173(1): 728-741, 2017; Raimondo et al., Oncotarget. 6(23): 19514, 2015; Ju et al., Mol. Therapy. 21(7):1345-1357, 2013; Wang et al., Molecular Therapy. 22(3): 522-534, 2014; и Regente et al, J of Exp. Biol. 68(20): 5485-5496, 2017; каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. Дополнительные примеры маркеров растительных EV перечислены в приложении и дополнительно описаны в данном документе.

В некоторых случаях маркер растительной EV может предусматривать растительный липид. Примеры растительных липидных маркеров, которые можно обнаружить в PMP, включают фитостерин, кампестерин, β-ситостерин, стигмастерин, авенастерин, гликозилинозитолфосфорилцерамиды (GIPC), гликолипиды (например, моногалактозилдиацилглицерин (MGDG) или дигалактозилдиацилглицерин (DGDG)) или их комбинацию. Например, PMP может содержать GIPC, которые представляют собой основной класс сфинголипидов в растениях и являются одними из наиболее распространенных мембранных липидов в растениях. Другие маркеры растительных EV могут включать липиды, которые накапливаются в растениях в ответ на абиотические или биотические стрессовые факторы (например, бактериальную или грибковую инфекцию), такие как фосфатидная кислота (PA) или фосфатидилинозитол-4-фосфат (PI4P).

В качестве альтернативы маркер растительной EV может включать растительный белок. В некоторых случаях белковый маркер растительной EV может представлять собой противомикробный белок, продуцируемый растениями в естественных условиях, включая защитные белки, которые растения секретируют в ответ на абиотические или биотические стрессовые факторы (например, бактериальную или грибковую инфекцию). Растительные белки, использующиеся для защиты от патогенов, включают растворимые белки семейства рецепторного белка, представляющего собой белок, ассоциированный с

фактором, чувствительным к N-этилмалемиду (SNARE) (например, синтаксин-121 (SYP121; № доступа в GenBank: NP_187788.1 или NP_974288.1), Penetration1 (PEN1; № доступа в GenBank: NP_567462.1)) или ABC-транспортер Penetration3 (PEN3; № доступа в GenBank: NP_191283.2). Другие примеры маркеров растительных EV включают белки, которые облегчают транспорт РНК на большие расстояния в растениях, включая белки флоэмы (например, белок флоэмы 2-A1 (PP2-A1), номер доступа в GenBank: NP_193719.1), кальций-зависимые липидсвязывающие белки или лектины (например, родственные джакалину лектины, например, джакалин Helianthus annuus (Helja; № доступа в GenBank: AHZ86978.1). Например, РНК-связывающий белок может представлять собой богатый глицином РНК-связывающий белок 7 (GRP7; номер доступа в GenBank: NP_179760.1). Кроме того, в некоторых случаях в растительных EV могут встречаться белки, которые регулируют функцию плазмодесм, включая белки, такие как синаптотагмин A A (номер доступа в GenBank: NP_565495.1). В некоторых случаях маркер растительной EV может включать белок, участвующий в метаболизме липидов, такой как фосфолипаза C или фосфолипаза D. В некоторых случаях белковый маркер растительной EV представляет собой белок клеточного транспорта в растениях. В определенных случаях, когда маркер растительной EV представляет собой белок, белковый маркер может не иметь сигнального пептида, который обычно ассоциирован с секретируемыми белками. Нестандартные секреторные белки, по-видимому, обладают несколькими общими свойствами, такими как (i) отсутствие лидерной последовательности, (ii) отсутствие посттрансляционных модификаций (PTM), специфических для ER или аппарата Гольджи, и/или (iii) секреция, на которую не оказывает влияния брефельдин A, который блокирует классический путь секреции, зависимый от ER/аппарата Гольджи. Специалист в данной области техники может использовать различные общедоступные инструменты (например, базу данных SecretomeP; SUBA3 (база данных субклеточной локализации белков растений рода Arabidopsis)) для оценки белка на наличие сигнальной последовательности или ее отсутствие.

В случаях, когда маркер растительной EV представляет собой белок, белок может иметь аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с маркером растительной EV, таким как любой из маркеров растительных EV, перечисленных в приложении. Например, белок может иметь аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с PEN1 из Arabidopsis thaliana (номер доступа в GenBank: NP_567462.1).

В некоторых случаях маркер растительной EV включает нуклеиновую кислоту, кодируемую растениями, например, растительную РНК, растительную ДНК или растительную PNA. Например, PMP может содержать dsRNA, мРНК, вирусную РНК,

микроРНК (miRNA) или малую интерферирующую РНК (siRNA), кодируемые растением. В некоторых случаях нуклеиновая кислота может представлять собой нуклеиновую кислоту, которая ассоциирована с белком, который облегчает транспорт РНК на большие расстояния в растениях, как обсуждается в данном документе. В некоторых случаях маркер растительной EV, представляющий собой нуклеиновую кислоту, может быть вовлечен в индуцируемый хозяином сайленсинг генов (HIGS), который представляет собой процесс, с помощью которого растения осуществляют сайленсинг чужеродных транскриптов вредителей растений (например, патогенов, таких как грибы). Например, нуклеиновая кислота может представлять собой нуклеиновую кислоту, которая осуществляет сайленсинг генов бактерий или грибов. В некоторых случаях нуклеиновая кислота может представлять собой микроРНК, такую как miR159 или miR166, которые нацеливаются на гены грибкового патогена (например, Verticillium dahliae). В некоторых случаях белок может представлять собой белок, вовлеченный в перенос защитных соединений растения, такой как белки, вовлеченные в транспорт и метаболизме глюкозинолатов (GSL), включая транспортер-1 -1 глюкозинолатов (GTR1; № доступа в GenBank: NP_566896.2), транспортер-2 глюкозинолатов (GTR2; NP_201074.1) или эпитиоспецифический модификатор 1 (ESM1; NP_188037.1).

В случаях, когда маркер растительной EV представляет собой нуклеиновую кислоту, нуклеиновая кислота может иметь нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с маркером растительной EV, например, с последовательностями, кодирующими маркеры растительных EV, перечисленные в приложении. Например, нуклеиновая кислота может иметь полинуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с miR159 или miR166.

В некоторых случаях маркер растительной EV включает соединение, продуцируемое растениями. Например, соединение может представлять собой защитное соединение, продуцируемое в ответ на абиотические или биотические стрессовые факторы, такое как вторичные метаболиты. Одними из таких вторичных метаболитов, которые можно обнаружить в PMP, являются глюкозинолаты (GSL), которые представляют собой азот- и серосодержащие вторичные метаболиты, встречающиеся главным образом в растениях семейства Brassicaceae. Другие вторичные метаболиты могут включать аллелохимические вещества.

В некоторых случаях PMP также может быть идентифицирован как полученный с использованием растительной EV на основе отсутствия определенных маркеров (например, липидов, полипептидов или полинуклеотидов), которые, как правило, не продуцируются в растениях, а обычно ассоциированы с другими организмами (например, маркеры животных EV, бактериальных EV или грибковых EV). Например, в некоторых случаях PMP не содержит липидов, которые обычно встречаются в животных EV,

бактериальных EV или грибковых EV. В некоторых случаях PMP не содержит липидов, типичных для животных EV (например, сфингомиелина). В некоторых случаях PMP не содержит липидов, типичных для бактериальных EV или бактериальных мембран (например, LPS). В некоторых случаях PMP не содержит липидов, типичных для мембран грибов (например, эргостерина).

Маркеры растительных EV могут быть идентифицированы с использованием любых известных из уровня техники подходов, которые позволяют идентифицировать низкомолекулярные соединения (например, масс-спектроскопии, масс-спектрометрии), липиды (например, масс-спектроскопии, масс-спектрометрии), белки (например, масс-спектроскопии, иммуноблоттинга) или нуклеиновые кислоты (например, ПЦР-анализа). В некоторых случаях композиция на основе PMP, описанная в данном документе, содержит выявляемое количество, например, предварительно определенное пороговое количество маркера растительной EV, описанного в данном документе.

C. Загрузка средств

PMP могут быть модифицированы для включения гетерологичного средства, модифицирующего растения, такого как средства, описанные в данном документе. PMP могут нести такие средства или могут быть ассоциированы с ними с помощью различных способов, которые обеспечивают доставку средства в целевое растение, например, за счет инкапсулирования средства, включения компонента в структуру из липидного бислоя или ассоциации компонента (например, посредством конъюгирования) с поверхностью структуры PMP из липидного бислоя.

Гетерологичное средство, модифицирующее растения, может быть включено или загружено в PMP на него посредством любых способов, известных из уровня техники, которые обеспечивают непосредственную или опосредованную ассоциацию PMP и средства. Гетерологичное средство, модифицирующее растения, можно включать в PMP посредством способа in vivo (например, in planta, например, благодаря получению PMP из трансгенного растения, содержащего гетерологичное средство), или in vitro (например, в культуре ткани или в культуре клеток), или посредством способов одновременно in vivo и in vitro .

В случаях, когда PMP загружают гетерологичным средством, модифицирующим растения, in vivo, PMP могут быть получены с использованием EV, или их сегментов или частей, или экстракта, содержащего EV, которые были загружены in planta. Способы in planta предусматривают экспрессию гетерологичного средства, модифицирующего растения, растении, которое было подвергнуто генетической модификации для экспрессии гетерологичного средства, модифицирующего растения, и его загрузки в EV. В некоторых случаях гетерологичное средство, модифицирующее растения, является экзогенным для растения. В качестве альтернативы гетерологичное средство, модифицирующее растения, может встречаться в растении в естественных условиях, но его сконструировали для экспрессии на повышенном уровне по сравнению с уровнем, встречающимся в растении, которое не было подвергнуто генетической модификации.

В некоторых случаях PMP можно загружать in vitro. Вещество может быть загружено на PMP или в него (например, может быть инкапсулировано) с использованием без ограничения физических, химических и/или биологических способов (например, в культуре ткани или в культуре клеток). Например, гетерологичное средство, модифицирующее растения, можно вводить в PMP посредством одного или нескольких из электропорации, обработки ультразвуком, пассивной диффузии, перемешивания, экстракции липидов или экструзии. Загруженные PMP можно оценивать для подтверждения присутствия или количества загруженного средства с использованием различных способов, таких как HPLC (например, для оценки низкомолекулярных соединений); иммуноблоттинг (например, для оценки белков) и количественная ПЦР (например, для оценки нуклеотидов). Однако специалистам в данной области техники должно быть понятно, что загрузка представляющего интерес вещества в PMP не ограничивается проиллюстрированными выше способами.

В некоторых случаях гетерологичное средство, модифицирующее растения, может быть конъюгировано с PMP, при этом гетерологичное средство, модифицирующее растения, опосредованно или непосредственно связано или присоединено к PMP. Например, одно или несколько средств, модифицирующих растения, могут быть химически связаны с PMP так, чтобы одно или несколько средств, модифицирующих растения, присоединялись (например, посредством ковалентных или ионных связей) непосредственно к липидному бислою PMP. В некоторых случаях конъюгирование различных средств, модифицирующих растения, с PMP может быть достигнуто посредством изначального смешивания одного или нескольких гетерологичных средств, модифицирующих растения, с подходящим сшивающим средством (например, N-этилкарбодиимидом ("EDC"), который обычно используется в качестве карбоксил-активирующего средства для образования амидной связи с первичными аминами, а также реагирует с фосфатными группами) в подходящем растворителе. После периода инкубации, достаточного для обеспечения присоединения гетерологичного средства, модифицирующего растения, к сшивающему средству, затем смесь сшивающего средства/гетерологичного средства, модифицирующего растения, можно объединить с PMP и после еще одного периода инкубации подвергнуть действию градиента сахарозы (например, 8, 30, 45 и 60% градиента сахарозы) для отделения свободного гетерологичного средства, модифицирующего растения, и свободных PMP от средств, модифицирующих растения, конъюгированных с PMP. В рамках объединения смеси с градиентом сахарозы и сопутствующей стадии центрифугирования PMP, конъюгированные со средствами, модифицирующими растения, затем наблюдаются в виде полосы в градиенте сахарозы, так что конъюгированные PMP затем могут быть собраны, промыты и растворены в подходящем растворе для применения, как описано в данном документе.

В некоторых случаях PMP являются стабильно ассоциированными с гетерологичным средством, модифицирующим растения, до и после доставки PMP,

например, в растение. В других случаях PMP ассоциированы с гетерологичным средством, модифицирующим растения, так, чтобы гетерологичное средство, модифицирующее растения, диссоциировало от PMP после доставки PMP, например, в растение.

PMP могут быть дополнительно модифицированы другими компонентами (например, липидами, например, стеринами, например, холестерином; или низкомолекулярными соединениями) для дополнительного изменения функциональных и структурных характеристик PMP. Например, PMP можно дополнительно модифицировать с помощью стабилизирующих молекул, которые повышают стабильность PMP (например, они стабильны в течение по меньшей мере одного дня при комнатной температуре и/или в течение по меньшей мере одной недели при 4°C).

PMP можно загружать различными концентрациями гетерологичного средства, модифицирующего растения, в зависимости от конкретного средства или применения. Например, в некоторых случаях PMP загружают таким образом, что композиция для модификации растений, раскрытая в данном документе, содержит приблизительно 0,001, 0,01, 0,1, 1,0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, или 95 (или любой диапазон от приблизительно 0,001 до 95) или больше вес. % средства, модифицирующего растения. В некоторых случаях PMP загружают таким образом, что композиция для модификации растений содержит приблизительно 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1,0, 0,1, 0,01, 0,001 (или любой диапазон от приблизительно 95 до 0,001) или меньше вес. % средства, модифицирующего растения. Например, композиция для модификации растений может содержать от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,01 вес. %, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,1 вес. %, от приблизительно 0,1 до приблизительно 1 вес. %, от приблизительно 1 до приблизительно 5 вес. % или от приблизительно 5 до приблизительно 10 вес. %, от приблизительно 10 до приблизительно 20 вес. % средства, модифицирующего растения. В некоторых случаях PMP могут быть загружены приблизительно 1, 5, 10, 50, 100, 200 или 500, 1000, 2000 (или в любом диапазоне от приблизительно 1 до 2000) или больше мкг/мл средства, модифицирующего растения. В некоторых случаях PMP могут быть загружены приблизительно 2000, 1000, 500, 200, 100, 50, 10, 5, 1 (или в любом диапазоне от приблизительно 2000 до 1) или меньше мкг/мл средства, модифицирующего растения.

В некоторых случаях PMP загружают таким образом, что композиция для модификации растений, раскрытая в данном документе, содержит по меньшей мере 0,001 вес. %, по меньшей мере 0,01 вес. %, по меньшей мере 0,1 вес. %, по меньшей мере 1,0 вес. %, по меньшей мере 2 вес. %, по меньшей мере 3 вес. %, по меньшей мере 4 вес. %, по меньшей мере 5 вес. %, по меньшей мере 6 вес. %, по меньшей мере 7 вес. %, по меньшей мере 8 вес. %, по меньшей мере 9 вес. %, по меньшей мере 10 вес. %, по меньшей мере 15 вес. %, по меньшей мере 20 вес. %, по меньшей мере 30 вес. %, по меньшей мере 40 вес. %, по меньшей мере 50 вес. %, по меньшей мере 60 вес. %, по меньшей мере 70 вес. %, по меньшей мере 80 вес. %, по меньшей мере 90 вес. % или по меньшей мере 95 вес. %

средства, модифицирующего растения. В некоторых случаях PMP могут быть загружены по меньшей мере 1 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл, по меньшей мере 100 мкг/мл, по меньшей мере 200 мкг/мл, по меньшей мере 500 мкг/мл, по меньшей мере 1000 мкг/мл, по меньшей мере 2000 мкг/мл гетерологичного средства, модифицирующего растения.

Примеры конкретных гетерологичных средств, модифицирующих растения, которые могут быть загружены в PMP, дополнительно описаны в разделе, озаглавленном "Гетерологичные средства, модифицирующие растения".

D. Составы

Чтобы обеспечить простоту применения, обработки, транспортировки, хранения и активности, композиции для модификации растений могут быть составлены с другими веществами, такими как приемлемые с точки зрения сельского хозяйства носители. Композиция для модификации растений может быть составлена, например, в виде приманок, концентрированных эмульсий, пылевидных препаратов, эмульгируемых концентратов, фумигантов, гелей, гранул, микроинкапсулированных препаратов, средств для обработки семян, суспензионных концентратов, суспоэмульсий, таблеток, водорастворимых жидкостей, диспергируемых в воде гранул или сухих текучих составов, смачиваемых порошков и растворов сверхмалого объема.

Композиции для модификации растений можно применять в виде водных суспензий или эмульсий, приготовленных из концентрированных составов таких средств. Такие водорастворимые, суспендируемые в воде или эмульгируемые составы представляют собой либо твердые вещества, обычно известные как смачиваемые порошки или диспергируемые в воде гранулы, либо жидкости, обычно известные как эмульгируемые концентраты или водные суспензии. Смачиваемые порошки, которые можно прессовать с образованием диспергируемых в воде гранул, содержат однородную смесь композиции для модификации растений, носителя и поверхностно-активных веществ. Носитель обычно выбран из аттапульгитовых глин, монтмориллонитовых глин, диатомитовых земель или очищенных силикатов. Эффективные поверхностно-активные вещества, содержащие от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% смачиваемого порошка, встречаются среди сульфированных лигнинов, конденсированных нафталинсульфонатов, нафталинсульфонатов, алкилбензолсульфонатов, алкилсульфатов и неионных поверхностно-активных веществ, таких как аддукты этиленоксида и алкилфенолов.

Эмульгируемые концентраты могут содержать подходящую концентрацию PMP и/или средства, модифицирующего растения, как, например, от приблизительно 50 до приблизительно 500 грамм на литр жидкости, растворенных в носителе, который представляет собой либо смешивающийся с водой растворитель, либо смесь не смешивающегося с водой органического растворителя и эмульгаторов. Применимые органические растворители включают ароматические соединения, в частности ксилолы, и фракции нефти, в частности нафталиновые и олефиновые фракции нефти с высокой

температурой кипения, такие как тяжелая ароматическая нафта. Можно также использовать другие органические растворители, такие как терпеновые растворители, в том числе производные канифоли, алифатические кетоны, такие как циклогексанон, и сложные спирты, такие как 2-этоксиэтанол. Подходящие эмульгаторы для эмульгируемых концентратов выбраны из традиционных анионных и неионных поверхностно-активных веществ.

Водные суспензии включают суспензии нерастворимых в воде композиций для модификации растений, диспергированных в водном носителе при концентрации в диапазоне от приблизительно 5% до приблизительно 50% по весу. Суспензии получают посредством тонкого измельчения активного средства и его интенсивного перемешивания с носителем, состоящим из воды и поверхностно-активных веществ. Для повышения плотности и вязкости водного носителя также можно добавлять такие ингредиенты, как неорганические соли и синтетические или натуральные камеди.

Композиции для модификации растений также можно применять в виде гранулированных композиций, которые особенно применимы для внесения в почву. Гранулированные композиции обычно содержат от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по весу композиции для модификации растений, диспергированной в носителе, который содержит глину или подобное вещество. Такие композиции обычно получают посредством растворения состава в подходящем растворителе и нанесения его на гранулированный носитель, который был предварительно сформирован для достижения соответствующего размера частиц в диапазоне от приблизительно 0,5 до приблизительно 3 мм. Такие композиции также можно составлять посредством получения тестообразной массы или пасты из носителя и соединения, а также измельчения и высушивания с получением гранулированных частиц требуемого размера.

Пылевидные препараты, содержащие композиции по настоящему изобретению, получают посредством тщательного перемешивания композиции для модификации растений в порошкообразной форме с подходящим пылевидным носителем, приемлемым для применения в сельском хозяйстве, таким как каолиновая глина, размолотая вулканическая порода и т. п. В подходящем случае пылевидные препараты могут содержать от приблизительно 1% до приблизительно 10% пакетов. Их можно применять для протравливания семян или для нанесения на листья с помощью опыливателя.

В равной степени практичным является применение состава по настоящему изобретению в форме раствора в подходящем органическом растворителе, обычно в нефтяном масле, таком как масла для опрыскивания, которые широко используются в сельскохозяйственной химии.

Композиции для модификации растений также можно применять в форме аэрозольной композиции. В таких композициях пакеты растворяют или диспергируют в носителе, который представляет собой создающую давление пропеллентную смесь. Аэрозольная композиция упакована в контейнер, из которого смесь распределяется через распылительный клапан.

Другой вариант осуществления представляет собой эмульсию типа масло-в-воде, где эмульсия содержит масляные глобулы, каждая из которых имеет слоистое жидкокристаллическое покрытие, и они диспергированы в водной фазе, где каждая масляная глобула содержит по меньшей мере одно соединение, которое является активным с точки зрения сельского хозяйства, и она индивидуально покрыта монослойным или олигослойным слоем, содержащим: (1) по меньшей мере одно неионогенное липофильное поверхностно-активное средство, (2) по меньшей мере одно неионогенное гидрофильное поверхностно-активное средство и (3) по меньшей мере одно ионогенное поверхностно-активное средство, где глобулы характеризуются средним диаметром частиц, составляющим менее 800 нанометров. Дополнительная информация об этом варианте осуществления раскрыта в публикации патента США 20070027034, опубликованной 1 февраля 2007 г. Для простоты использования этот вариант осуществления будет обозначаться как "OIWE".

Кроме того, как правило, когда в составе используются молекулы, раскрытые выше, такой состав также может содержать другие компоненты. Эти компоненты включают без ограничения (т. е. это не исчерпывающий и не исключающий список) смачиватели, распределители, клеящие вещества, вещества, обеспечивающие проникновение, буферы, секвестрирующие средства, средства для снижения сноса, средства, обеспечивающие совместимость, средства, препятствующие пенообразованию, чистящие средства и эмульгаторы. Далее описаны некоторые компоненты.

Смачивающее средство представляет собой вещество, которое при добавлении к жидкости повышает способность жидкости растекаться или ее проникающую способность за счет снижения межфазного натяжения между жидкостью и поверхностью, по которой она растекается. Смачивающие средства используются в агрохимических составах для выполнения двух основных функций: в ходе обработки и изготовления для повышения скорости смачивания порошков в воде для получения концентратов растворимых жидкостей или суспензионных концентратов; и в ходе смешивания продукта с водой в распылительном резервуаре для уменьшения времени смачивания смачиваемых порошков и улучшения проникновения воды в диспергируемые в воде гранулы. Примеры смачивающих средств, используемых в составах на основе смачиваемых порошков, суспензионных концентратов и диспергируемых в воде гранул, представляют собой лаурилсульфат натрия; диоктилсульфосукцинат натрия; этоксилаты алкилфенола и этоксилаты алифатических спиртов.

Диспергирующее средство представляет собой вещество, которое адсорбируется на поверхности частиц, а также способствует сохранению дисперсного состояния частиц и предотвращает их повторную агрегацию. Диспергирующие средства добавляют к агрохимическим составам для облегчения диспергирования и суспендирования в ходе изготовления и для гарантирования повторного диспергирования частиц в воде в распылительном резервуаре. Они широко используются в смачиваемых порошках, суспензионных концентратах и диспергируемых в воде гранулах. Поверхностно-активные

вещества, которые используются в качестве диспергирующих средств, обладают способностью сильно адсорбироваться на поверхности частиц и обеспечивать заряженный или стерический барьер для предотвращения повторной агрегации частиц. Наиболее часто используемыми поверхностно-активными веществами являются анионные, неионогенные или смеси этих двух типов. В случае составов на основе смачиваемых порошков наиболее распространенными диспергирующими средствами являются лигносульфонаты натрия. В случае суспензионных концентратов очень хорошую адсорбцию и стабилизацию получают с использованием полиэлектролитов, таких как конденсаты формальдегида и нафталинсульфоната натрия. Также используются сложные эфиры фосфорной кислоты и этоксилата тристирилфенола. Неионогенные вещества, такие как конденсаты алкиларилэтиленоксида и блок-сополимеры ЕО-РО, иногда комбинируют с анионными веществами в качестве диспергирующих средств для суспензионных концентратов. В последние годы в качестве диспергирующих средств были разработаны новые типы полимерных, очень высокомолекулярных поверхностно-активных веществ. Они имеют очень длинные гидрофобные "остовы" и большое количество этиленоксидных цепей, образующих "зубцы" "гребешка" поверхностно-активного вещества. Эти высокомолекулярные полимеры могут обеспечивать очень хорошую долговременную стабильность суспензионных концентратов, поскольку гидрофобные остовы имеют много точек прикрепления к поверхностям частиц. Примерами диспергирующих средств, используемых в агрохимических составах, являются лигносульфонаты натрия; конденсаты формальдегида и нафталинсульфоната натрия; сложные эфиры фосфорной кислоты и этоксилата тристирилфенола; этоксилаты алифатических спиртов; алкилэтоксилаты; блок-сополимеры ЕО-РО (этиленоксида - пропиленоксида) и привитые сополимеры.

Эмульгирующее средство представляет собой вещество, которое стабилизирует суспензию капель одной жидкой фазы в другой жидкой фазе. Без эмульгирующего средства две жидкости разделились бы на две несмешивающиеся жидкие фазы. Наиболее часто используемые смеси эмульгаторов содержат алкилфенол или алифатический спирт с двенадцатью или более звеньями этиленоксида и маслорастворимую кальциевую соль додецилбензолсульфоновой кислоты. Получение эмульсий с хорошей стабильностью обычно обеспечивает диапазон значений гидрофильно-липофильного баланса ("HLB") от 8 до 18. Стабильность эмульсии иногда может быть улучшена за счет добавления небольшого количества поверхностно-активного вещества, представляющего собой блок-сополимер ЕО-РО.

Солюбилизирующее средство представляет собой поверхностно-активное вещество, которое будет образовывать мицеллы в воде при концентрациях, превышающих критическую концентрацию мицеллообразования. Затем мицеллы способны растворять или солюбилизировать не растворимые в воде материалы внутри гидрофобной части мицеллы. Типы поверхностно-активных веществ, обычно используемых для солюбилизации, представляют собой неионогенные вещества, моноолеаты сорбитана,

этоксилаты моноолеатов сорбитана и сложные эфиры метилолеата.

Поверхностно-активные вещества иногда используют, либо отдельно, либо с другими добавками, такими как минеральные или растительные масла, в качестве вспомогательных средств в смесях в распылительных резервуарах для улучшения биологических свойств композиции для модификации растений на мишени. Типы поверхностно-активных веществ, используемых для биологического усиления, обычно зависят от природы и механизма действия композиции для модификации растений. Однако они часто представляют собой неионогенные вещества, такие как алкилэтоксилаты; этоксилаты линейных алифатических спиртов; этоксилаты алифатических аминов.

Носитель или разбавитель в составе для использования в сельском хозяйстве представляет собой материал, добавляемый к композиции для модификации растений для придания продукту необходимой прочности. Носители обычно представляют собой материалы с высокой абсорбционной способностью, тогда как разбавители обычно представляют собой материалы с низкой абсорбционной способностью. Носители и разбавители используются в составах пылевидных препаратов, смачиваемых порошков, гранул и диспергируемых в воде гранул.

Органические растворители используются в основном в составе эмульгируемых концентратов, эмульсий типа масло-в-воде, суспоэмульсий и составах сверхмалого объема, а также, в меньшей степени, в гранулированных составах. Иногда используются смеси растворителей. Первыми основными группами растворителей являются алифатические парафиновые масла, такие как керосин или очищенные парафины. Вторая основная группа (и наиболее распространенная) включает ароматические растворители, такие как ксилол и более высокомолекулярные фракции C9 и C10 ароматических растворителей. Хлорсодержащие углеводороды применимы в качестве сорастворителей для предупреждения кристаллизации композиции для модификации растений при эмульгировании состава в воде. Спирты иногда используются в качестве сорастворителей для повышения растворяющей способности. Другие растворители могут включать растительные масла, масла из семян и сложные эфиры из растительных масел и масел из семян.

Загустители или гелеобразующие средства используются в основном в составе суспензионных концентратов, эмульсий и суспоэмульсий для изменения реологических свойств или свойств текучести жидкости и предотвращения разделения и осаждения диспергированных частиц или капель. Загустители, гелеобразующие средства и средства, препятствующие осаждению, обычно делятся на две категории, а именно нерастворимые в воде твердые частицы и водорастворимые полимеры. Можно получать составы суспензионных концентратов с использованием глин и диоксидов кремния. Примеры этих типов материалов включают без ограничения монтмориллонит, бентонит, алюмосиликат магния и аттапульгит. Водорастворимые полисахариды использовались в качестве загустителей и гелеобразующих средств в течение многих лет. Наиболее часто

используемые типы полисахаридов представляют собой натуральные экстракты семян и морских водорослей или синтетические производные целлюлозы. Примеры этих типов материалов включают без ограничения гуаровую камедь; камедь рожкового дерева; каррагинан; альгинаты; метилцеллюлозу; натрийкарбоксиметилцеллюлозу (SCMC); гидроксиэтилцеллюлозу (HEC). Другие типы средств, препятствующих осаждению, основаны на модифицированных крахмалах, полиакрилатах, поливиниловом спирте и полиэтиленоксиде. Еще одним хорошим средством, препятствующим осаждению, является ксантановая камедь.

Микроорганизмы могут вызывать порчу составленных продуктов. Поэтому для устранения или снижения их влияния используются консерванты. Примеры таких средств включают без ограничения пропионовую кислоту и ее натриевую соль; сорбиновую кислоту и ее натриевые или калиевые соли; бензойную кислоту и ее натриевую соль; натриевую соль п-гидроксибензойной кислоты; метил-п-гидроксибензоат и 1,2-бензизотиазолин-3-он (BIT).

Присутствие поверхностно-активных веществ зачастую вызывает пенообразование в составах на водной основе в ходе операций смешивания при получении и при применении с помощью распылительного резервуара. Чтобы снизить тенденцию к пенообразованию, средства, препятствующие пенообразованию, часто добавляют либо в ходе стадии изготовления, либо перед разливом в бутылки. Как правило, существует два типа средств, препятствующих пенообразованию, а именно силиконы и отличные от силиконов средства. Силиконы обычно представляют собой водные эмульсии диметилполисилоксана, тогда как отличные от силиконов средства, препятствующие вспениванию, представляют собой нерастворимые в воде масла, такие как октанол и нонанол, или диоксид кремния. В обоих случаях функция средства, препятствующего пенообразованию, заключается в вытеснении поверхностно-активного вещества с границы раздела воздух-вода.

"Зеленые" средства (например, вспомогательные вещества, поверхностно-активные вещества, растворители) могут уменьшать общее негативное воздействие составов для защиты растительных культур на окружающую среду. "Зеленые" средства являются биоразлагаемыми и обычно получены из природных и/или пополняемых источников, например, из растительных и животных источников. Конкретными примерами являются: растительные масла, масла из семян и их сложные эфиры, а также алкоксилированные алкилполиглюкозиды.

В некоторых случаях композицию для модификации растений можно подвергать сублимационной сушке или лиофилизации. См. патент США № 4311712. Потом композицию для модификации растений можно восстанавливать путем контакта с водой или другой жидкостью. К лиофилизированным или восстановленным композициям могут быть добавлены другие компоненты, например, другие средства, модифицирующее растения, приемлемые с точки зрения сельского хозяйства носители или другие материалы в соответствии с составами, описанными в данном документе.

К другим необязательным признакам композиции относятся носители или средства для доставки, которые защищают композицию для модификации растений от УФ-излучения и/или кислотных условий. В некоторых случаях средство доставки содержит pH-буфер. В некоторых случаях композиция составлена таким образом, что она имеет pH в диапазоне от приблизительно 4,5 до приблизительно 9,0, включая, например, любой из диапазонов pH от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,0, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5 или от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,0.

Для получения дополнительной информации о составах для использования в сельском хозяйстве см. "Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations", под редакцией D. A. Knowles, 1998 авторские права принадлежат Kluwer Academic Publishers. Также см. "Insecticides in Agriculture and Environment-Retrospects and Prospects" A. S. Perry, I. Yamamoto, I. Ishaaya, and R. Perry, 1998 авторские права принадлежат Springer-Verlag.

II. Способы модификации растений

Композиции для модификации растений, описанные в данном документе, применимы в различных способах. Способы по настоящему изобретению включают доставку композиций для модификации растений, описанных в данном документе, в растение, такое как описанные в данном документе. Композиции и соответствующие способы можно применять для модификации растения или частей растения (например, листьев, корней, цветков, плодов или семян), чтобы повышать приспособленность растений. Подробности каждого из этих способов дополнительно описаны ниже.

A. Доставка в растение

В данном документе представлены способы доставки композиции для модификации растений в растение (например, такому как раскрыты в разделе, озаглавленном "Растения"). Включены способы доставки композиции для модификации растений в растения путем приведения растения или его части в контакт с композицией для модификации растений. Способы применимы для модификация растения, чтобы повышать его приспособленность.

В одном аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, где способ включает доставку в растение композиции для модификации растений, описанной в данном документе (например, в эффективном количестве и в течение эффективного периода времени), для повышения приспособленности растения по сравнению с необработанным растением (например, растением, в которое не доставили композицию для модификации растений).

Повышение приспособленности растения как следствие доставки композиции для модификации растений может проявляться несколькими путями, например, приводя тем самым к более высокой производительности растения, например, улучшенной урожайности, улучшенной жизнеспособности растения или качества продукта, собираемого с растения, улучшению признаков, имеющихся до или после сбора урожая, которые требуются для сельского хозяйства или садоводства (например, вкуса, внешнего вида, срока хранения), или улучшению признаков, которые иным образом приносят

пользу людям (например, понижение продуцирования аллергенов). Повышение урожайности растения относится к повышению урожайности продукта (например, как измерено по биомассе растения, урожаю зерна, семян или плодов, содержанию белка, содержанию углеводов или масел или площади листьев) растения на измеримую величину по сравнению с урожайностью того же продукта растения, полученного в тех же условиях, но без применения композиций по настоящему изобретению, или по сравнению с применением традиционных средств, модифицирующих растения (например, средств, модифицирующих растения, доставляемых без использования PMP). Например, урожайность может быть повышена на по меньшей мере приблизительно 0,5%, приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100% или более 100%. В некоторых случаях способ является эффективным для повышения урожайности в приблизительно 2, 5, 10, 25, 50, 75, 100 или более 100 раз по сравнению с необработанным растением. Урожайность может выражаться в единицах количества по массе или объему растения или продукта растения на некоторой основе. Основа может выражаться в единицах времени, площади выращивания, веса полученных растений или количества используемого сырья. Например, такие способы могут приводить к повышению урожайности растительных тканей, включая без ограничения семена, плоды, ядра, семенные коробочки, клубни, корни и листья.

Повышение жизнеспособности растения как следствие доставки композиции для модификации растений также можно измерять иным способом, как, например, по повышению или улучшению показателя жизнеспособности, густоты (количества растений на единицу площади), высоты растения, окружности стебля, длина стебля, количества листьев, размера листа, листового полога, внешнего вида (например, более зеленого цвета листьев), оценки корней, всхожести, содержанию белка, повышенному кущению, более крупным листьям, большему количеству листьев, меньшему количеству мертвых прикорневых листьев, более сильным росткам, потребности в меньшем количестве удобрений, потребности в меньшем количестве семян, более продуктивным росткам, более раннему цветению, более раннему созреванию зерна или семян, меньшему полеганию растений (вылеганию), усиленному росту побегов, более раннему прорастанию или любой комбинации этих факторов на измеримую или заметную величину по сравнению с тем же фактором растения, производимого в тех же условиях, но без введения композиций по настоящему изобретению или с применением традиционных средств, модифицирующих растения (например, средств, модифицирующих растения, доставляемых без использования PMP).

Соответственно, в данном документе представлен способ модификации растения, при этом способ включает доставку в растение эффективного количества любой композиции для модификации растений, представленной в данном документе, где способ

осуществляет модификацию растения и за счет этого осуществляет введение или усиление полезного признака в растении (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением. В частности, способ может обеспечивать повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В некоторых случаях повышение приспособленности растения представляет собой повышение (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) устойчивости к болезням, засуховыносливости, жаровыносливости, холодовыносливости, солевыносливости, выносливости к металлам, выносливости к гербицидам, выносливости к химическим веществам, эффективности использования воды, использования азота, устойчивости к азотному стрессу, фиксации азота, устойчивости к вредителям, устойчивости к травоядным животным, устойчивости к патогенам, урожайности, урожайности в условиях ограниченного количества воды, жизнеспособности, роста, фотосинтетического потенциала, питания, содержания белка, содержания углеводов, содержания масла, биомассы, длины побегов, длины корней, показателя структуры корневой системы, веса семян или количества собираемого урожая.

В некоторых случаях повышение приспособленности представляет собой ускорение (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) развития, роста, повышение урожайности, устойчивости к абиотическим стрессовым факторам или устойчивости к биотическим стрессовым факторам. Абиотический стресс относится к стрессовому воздействию окружающей среды, которому подвергается растение или часть растения, которое включает, например, стресс, вызываемый засухой, солевой стресс, тепловой стресс, холодовой стресс и стресс, вызываемый низким содержанием питательных веществ. Биотический стресс относится к стрессовому воздействию окружающей среды, которому подвергается растение или часть растения, которое включает, например, стресс, вызываемый нематодами, стресс, вызываемый травоядными насекомыми, стресс, вызываемый грибковыми патогенами, стресс, вызываемый бактериальными патогенами, или стресс, вызываемый вирусными патогенами. Стресс может быть временным, например, длится несколько часов, несколько дней, несколько месяцев, или постоянным, например, длится в течение жизни растения.

В некоторых случаях повышение приспособленности растения представляет собой повышение (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) качества продуктов, собираемых с растения. Например, повышение приспособленности растения может быть улучшением коммерчески благоприятных признаков (например, вкуса или внешнего вида) продукта, собираемого с растения. В других случаях повышение приспособленности растения представляет собой повышение срока хранения продукта, собираемого с растения

(например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%).

В качестве альтернативы повышение приспособленности может представлять собой изменение признака, который полезен для здоровья человека или животного, как, например, снижение продуцирования аллергена. Например, повышение приспособленности может представлять собой снижение (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) продуцирования аллергена (например, пыльцы), который стимулирует иммунный ответ у животного (например, человека).

Модификация растения (например, повышение приспособленности) может возникать в результате модификации одной или нескольких частей растения. Например, растение можно модифицировать посредством приведения в контакт с листом, семенем, пыльцой, корнем, плодом, побегом, цветком, клетками, протопластами или тканью (например, меристематической тканью) растения. По этой причине в другом аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает приведение пыльцы растения в контакт с эффективным количеством любой из композиций для модификации растений, представленных в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В еще одном аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает приведение семени растения в контакт с эффективным количеством любой из композиций для модификации растений, раскрытых в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В другом аспекте в данном документе представлен способ, включающий приведение протопласта растения в контакт с эффективным количеством любой из композиций для модификации растений, представленных в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В дополнительном аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает приведение растительной клетки растения в контакт с эффективным количеством любой из композиций для модификации растений, представленных в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В другом аспекте в данном документе представлен способ повышения

приспособленности растения, при этом способ включает приведение меристематической ткани растения в контакт с эффективным количеством любой из композиций для модификации растений, представленных в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

В другом аспекте в данном документе представлен способ повышения приспособленности растения, при этом способ включает приведение зародыша растения в контакт с эффективным количеством любой из композиций для модификации растений, представленных в данном документе, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения (например, на приблизительно 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, или более 100%) по сравнению с необработанным растением.

B. Способы применения

Растение, описанное в данном документе, можно подвергать воздействию любой из композиций, описанных в данном документе, с помощью любого подходящего способа, который обеспечивает доставку или введение композиции в растение. Композицию для модификации растений можно доставлять либо отдельно, либо в комбинации с другими активными (например, удобрениями) или неактивными веществами и можно наносить, например, посредством распыления, инъекции (например, микроинъекции), через растения, посредством полива, погружения, в форме концентрированных жидкостей, гелей, растворов, суспензий, спреев, порошков, пеллет, брикетов, плиток и т. п., составленных для доставки эффективной концентрации композиции для модификации растений. Количества и места для применения композиций, описанных в данном документе, как правило, определяются условиями обитания растения, стадией жизненного цикла, на которой на растение можно целенаправленно воздействовать композицией для модификации растений, участком, в котором следует выполняться применение, а также физическими и функциональными характеристиками композиции для модификации растений.

В некоторых случаях композицию распыляют непосредственно на растение, например, сельскохозяйственные культуры, например, путем распыления из ранца, распыления с воздуха, опрыскивания/опыления сельскохозяйственных культур и т. д. В тех случаях, когда композицию для модификации растений доставляют в растение, растение, получающее композицию для модификации растений, может находиться на любой стадии роста растений. Например, составленные композиции для модификации растений можно применять в виде покрытия для семян или средства для обработки корней на ранних стадиях роста растения или в виде средства для полной обработки растения на более поздних стадиях цикла сельскохозяйственного растения. В некоторых случаях композицию для модификации растений можно применять по отношению к растению в виде средства для местного применения.

Кроме того, композицию для модификации растений можно применять (например, в отношении почвы, в которой растет растение, или в отношении воды, которую используют для полива растения) в качестве системного средства, которое поглощается и распределяется по тканям растения. В некоторых случаях растения или употребляемые в пищу организмы могут быть генетически трансформированы для экспрессии композиции для модификации растений.

Замедленного или непрерывного высвобождения также можно достигнуть за счет покрытия композиции для модификации растений или композиции с композицией(-ями) для модификации растений растворимым или биодеградируемым слоем, таким так желатин, при этом затем данное покрытие растворяется или разрушается в среде ее использования, что делает композицию для модификации растений доступной, или за счет распределения средства в растворимой или разрушаемой матрице. Таки средства/устройства с непрерывным высвобождение и/или распределением могут предпочтительно использоваться для устойчивого поддержания эффективной концентрации одной или нескольких композиций для модификации растений, описанных в данном документе.

В некоторых случаях композицию для модификации растений доставляют в часть растения, например, лист, семя, пыльцу, корень, плод, побег или цветок, или в ткань, клетку или протопласт. В некоторых случаях композицию для модификации растений доставляют в клетку растения. В некоторых случаях композицию для модификации растений доставляют в протопласт растения. В некоторых случаях композицию для модификации растений доставляют в ткань растения. Например, композицию можно доставлять в меристематическую ткань растения (например, апикальную меристему, латеральную меристему или интеркалярную меристему). В некоторых случаях композицию доставляют в постоянную ткань растения (например, простые ткани (например, паренхиму, колленхиму или склеренхиму) или сложную постоянную ткань (например, ксилему или флоэму)). В некоторых случаях композицию доставляют в зародыш растения.

В некоторых случаях композиция для модификации растений может быть рекомендована для применения в полевых условиях в виде количества PMP на гектар (г/га или кг/га) или количества активного ингредиента (например, средства, модифицирующего растения) или его кислотного эквивалента на гектар (кг а.и./га или г а.и./га). В некоторых случаях меньшее количество средства, модифицирующего растения, в композициях по настоящему изобретению может потребоваться при внесении в почву, среду для растений, семена, растительную ткань или растения для достижения тех же результатов, что и в случае применения средства, модифицирующего растения, в композиции, не содержащей PMP. Например, средство, модифицирующее растения, может применяться в количестве на уровнях, которые в приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 50 или 100 раз меньше (или в любом диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 100 раз, например, в приблизительно 2-10 раз; приблизительно 5-15 раз, приблизительно 10-20 раз;

приблизительно 10-50 раз), чем то же средство, модифицирующее растения, применяемое в композиции, не содержащей PMP, например, при непосредственном нанесении того же средства, модифицирующего растения, без PMP. Композиции для модификации растений по настоящему изобретению можно применять в различных количествах на гектар, например, при приблизительно 0,0001, 0,001, 0,005, 0,01, 0,1, 1, 2, 10, 100, 1000, 2000, 5000 (или в любом диапазоне от 0,0001 до 5000) кг/га. Например, от приблизительно 0,0001 до приблизительно 0,01, от приблизительно 0,01 до приблизительно 10, от приблизительно 10 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000 кг/га.

III. Растения

Композицию для модификации растений, описанную в данном документе, можно доставлять во множество растений или обрабатывать их ею. Растения, в которые может быть доставлена композиция для модификации растений (т. е. "подвергаемые обработке") в соответствии со способами по настоящему изобретению включают целые растения и их части, в том числе без ограничения органы/структуры вегетативных побегов (например, листья, стебли и клубни), корни, цветки и органы/структуры цветков (например, прицветники, чашелистики, лепестки, тычинки, плодолистики, пыльники и семяпочки), семена (в том числе зародыш, эндосперм, семядоли и семенную кожуру) и плоды (зрелую завязь), растительную ткань (например, сосудистую ткань, основную паренхиму и т. п.) и клетки (например, замыкающие клетки, яйцеклетки и т. п.) и их потомство. Дополнительно части растения могут относиться к частям растения, таким как побег, корень, стебель, семена, прилистники, листья, лепестки, цветки, семяпочки, прицветники, ветви, черешки, междоузлия, кора, опушение, ростки, корневища, вайи, пластинки, пыльца, тычинки и т. п.

Класс растений, которые можно обрабатывать способом, раскрытым в данном документе, включает класс высших и низших растений, в том числе покрытосеменные (однодольные и двудольные растения), голосеменные, папоротники, хвощи, псилофиты, ликофиты, мохообразные и водоросли (например, многоклеточные или одноклеточные водоросли). Растения, которые можно обрабатывать в соответствии со способами по настоящему изобретению, дополнительно включают любое сосудистое растение, например, однодольные, или двудольные, или голосеменные, в том числе без ограничения люцерну, яблоню, растение рода Arabidopsis, банан, ячмень, канолу, клещевину, цикорий, хризантему, клевер, какао, кофе, хлопчатник, семена хлопчатника, кукурузу, крамбе, клюкву, огурец, дендробиум, диоскорею, эвкалипт, овсяницу, лен, гладиолус, растения семейства Лилейные, семя льна, просо, дыню, горчицу, овес, масличную пальму, масличный рапс, папайю, арахис, ананас, декоративные растения, фасоль, картофель, рапс, рис, рожь, райграс, сафлор, кунжут, сорго, сою, сахарную свеклу, сахарный тростник, подсолнечник, клубнику, табак, томат, газонную траву, пшеницу и овощные культуры, такие как салат, сельдерей, брокколи, цветная капуста, тыквенные культуры; фруктовые и ореховые деревья, такие как яблоня, груша, персик, апельсин, грейпфрут, лимон, лайм, миндаль, пекан, грецкий орех, лещина; вьющиеся растения, такие как

виноград (например, виноградник), киви, хмель; плодовые кустарники и колючие кустарники, такие как малина, ежевика, крыжовник; лесные деревья, такие как ясень, сосна, пихта, клен, дуб, каштан, тополь; такое как люцерна, канола, клещевина, кукуруза, хлопчатник, крамбе, лен, семя льна, горчицу, масличную пальму, масличный рапс, арахис, картофель, рис, сафлор, кунжут, сою, сахарную свеклу, подсолнечник, табак, томат или пшеницу. Растения, которые можно обрабатывать в соответствии со способами по настоящему изобретению, включают любое культурное растение, например, кормовую культуру, масличную культуру, зерновую культуру, плодовую культуру, овощную культуру, волокнистую культуру, пряную культуру, ореховую культуру, газонную культуру, сахарную культуру, культуру для производства напитков и лесную культуру. В определенных случаях культурное растение, которое обрабатывают в этом способе, представляет собой растение сои. В других определенных случаях культурное растение представляет собой пшеницу. В определенных случаях культурное растение представляет собой кукурузу. В определенных случаях культурное растение представляет собой хлопчатник. В определенных случаях культурное растение представляет собой люцерну. В определенных случаях культурное растение представляет собой сахарную свеклу. В определенных случаях культурное растение представляет собой рис. В определенных случаях культурное растение представляет собой томат. В определенных случаях культурное растение представляет собой картофель.

В определенных случаях растение представляет собой сельскохозяйственную культуру. Примеры таких культурных растений включают без ограничения однодольные и двудольные растения, включая без ограничения фуражные или кормовые бобовые, декоративные растения, сельскохозяйственные культуры, используемые в пищу, деревья или кустарники, выбранные из Acer spp., Allium spp., Amaranthus spp., Ananas comosus, Apium graveolens, Arachis spp, Asparagus officinalis, Beta vulgaris, Brassica spp. (например, , Brassica napus, Brassica rapa ssp. (канолы, масличного рапса, капусты полевой), Camellia sinensis, Canna indica, Cannabis saliva, Capsicum spp., Castanea spp., Cichorium endivia, Citrullus lanatus, Citrus spp., Cocos spp., Coffea spp., Coriandrum sativum, Corylus spp., Crataegus spp., Cucurbita spp., Cucumis spp., Daucus carota, Fagus spp., Ficus carica, Fragaria spp., Ginkgo biloba, Glycine spp. (например, , Glycine max, Soja hispida или Soja max), Gossypium hirsutum, Helianthus spp. (например, , Helianthus annuus), Hibiscus spp., Hordeum spp. (например, , Hordeum vulgare), Ipomoea batatas, Juglans spp., Lactuca sativa, Linum usitatissimum, Litchi chinensis, Lotus spp., Luffa acutangula, Lupinus spp., Lycopersicon spp. (например, , Lycopersicon esculenturn, Lycopersicon lycopersicum, Lycopersicon pyriforme), Malus spp., Medicago sativa, Mentha spp., Miscanthus sinensis, Morus nigra, Musa spp., Nicotiana spp., Olea spp., Oryza spp. (например, , Oryza sativa, Oryza latifolia), Panicum miliaceum, Panicum virgatum, Passiflora edulis, Petroselinum crispum, Phaseolus spp., Pinus spp., Pistacia vera, Pisum spp., Poa spp., Populus spp., Prunus spp., Pyrus communis, Quercus spp., Raphanus sativus, Rheum rhabarbarum, Ribes spp., Ricinus communis, Rubus spp., Saccharum spp., Salix sp., Sambucus spp., Secale cereale, Sesamum spp., Sinapis spp., Solanum

spp. (например, , Solanum tuberosum, Solanum integrifolium или Solanum lycopersicum), Sorghum bicolor, Sorghum halepense, Spinacia spp., Tamarindus indica, Theobroma cacao, Trifolium spp., Triticosecale rimpaui, Triticum spp. (например, , Triticum aestivum, Triticum durum, Triticum turgidum, Triticum hybernum, Triticum macha, Triticum sativum или Triticum vulgare), Vaccinium spp., Vicia spp., Vigna spp., Viola odorata, Vitis spp., и Zea mays. В определенных вариантах осуществления культурное растение представляет собой рис, масличный рапс, канолу, сою, кукурузу (маис), хлопчатник, сахарный тростник, люцерну, сорго или пшеницу.

В определенном случае композиции и способы можно применять для обработки растений или частей растений, пищевых продуктов или кормовых продуктов после сбора урожая. В некоторых случаях пищевой или кормовой продукт представляет собой пищевой или кормовой продукт, полученный не из растений (например, продукт, съедобный для людей, ветеринарных животных или домашнего скота (например, грибы)).

Растение или часть растения для применения в настоящем изобретении включают растения на любой стадии развития растения. В определенных случаях доставка может происходить в ходе стадий прорастания, роста проростков, вегетативного роста и репродуктивного роста. В определенных случаях доставка в растение происходит в ходе стадий вегетативного и репродуктивного роста. В некоторых случаях композицию доставляют в пыльцу растения. В некоторых случаях композицию доставляют в семя растения. В некоторых случаях композицию доставляют в протопласт растения. В некоторых случаях композицию доставляют в ткань растения. Например, композицию можно доставлять в меристематическую ткань растения (например, апикальную меристему, латеральную меристему или интеркалярную меристему). В некоторых случаях композицию доставляют в постоянную ткань растения (например, простые ткани (например, паренхиму, колленхиму или склеренхиму) или сложную постоянную ткань (например, ксилему или флоэму)). В некоторых случаях композицию доставляют в зародыш растения. В некоторых случаях композицию доставляют в растительную клетку. Стадии вегетативного и репродуктивного роста также обозначаются в данном документе как "взрослые" или "зрелые" растения.

В тех случаях, когда композицию доставляют в часть растения, часть растения может быть модифицирована с помощью средства, модифицирующего растения. В качестве альтернативы средство, модифицирующее растения, может распределяться в другие части растения, которые впоследствии модифицируются средством, модифицирующим растения.

IV. Гетерологичные средства, модифицирующие растения

Композиции для модификации растений, описанные в данном документе, содержат одно или более гетерологичных средств, модифицирующих растения. Например, PMP могут инкапсулировать гетерологичное средство, модифицирующее растения. В качестве альтернативы или дополнения гетерологичное средство, модифицирующее растения, может быть встроено в поверхность PMP или конъюгировано с ней.

В некоторых случаях средство, модифицирующее растения, может включать пептид или нуклеиновую кислоту. Средство, модифицирующее растения, может представлять собой средство, которое повышает приспособленность различных растений, или может представлять собой средство, которое целенаправленно воздействует на одно или несколько специфических растений (например, специфический вид или род растений). Кроме того, в некоторых случаях композиции для модификации растений включают два или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10) различных средств, модифицирующих растения. В некоторых случаях гетерологичное средство, модифицирующее растения, предусматривает рибонуклеопротеин (RNP), например, содержит одну или несколько молекул РНК, ассоциированных с одним или несколькими РНК-связывающими белками.

Кроме того, в некоторых случаях гетерологичное средство, модифицирующее растения (например, средство, включающее молекулу нуклеиновой кислоты или пептид), может быть модифицировано. К примеру, модификация может представлять собой химическую модификацию, например, конъюгацию с маркером, например, флуоресцентным маркером или радиоактивным маркером. В других случаях модификация может включать конъюгацию или функциональную связь с фрагментом, что повышает стабильности, доставку, целенаправленное воздействие, биологическую доступность или период полужизни средства, например, липида, гликана, полимера (например, PEG), катионного фрагмента.

Примеры гетерологичных средств, модифицирующих растения (например, пептиды или нуклеиновые кислоты), которые можно использовать в раскрытых в данном документе композициях для модификации растений и способах, приведены ниже.

А. Полипептиды

Композиция для модификации растений (например, PMP), описанная в данном документе, может содержать гетерологичный полипептид. В некоторых случаях композиции для модификации растений, описанные в данном документе, содержат полипептид или его функциональные фрагменты или производное, которые модифицируют растение (например, повышают приспособленность растения). Например, полипептид может повышать приспособленность растения. Композицию для модификации растений, включающую полипептид, описанный в данном документе, можно приводить в контакт с растением в количестве и в течение времени, достаточных для: (a) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации полипептида и (b) модификации растения (например, повышения приспособленности растения).

Примеры полипептидов, которые могут быть использованы в данном документе, могут включать фермент (например, метаболическую рекомбиназу, геликазу, интегразу, РНКазу, ДНКазу или белок убиквитинирования), порообразующий белок, сигнальный лиганд, проникающий в клетку пептид, транскрипционный фактор, рецептор, антитело, нанотело, белок для редактирования генов (например, систему CRISPR-Cas, TALEN или

"цинковый палец"), рибопротеин, белковый аптамер или шаперон.

Полипептиды, включенные в данный документ, могут включать встречающиеся в природе полипептиды или рекомбинантно полученные варианты. В некоторых случаях полипептид может представлять собой его функциональные фрагменты или варианты (например, его ферментативно активный фрагмент или вариант). Например, полипептид может представлять собой функционально активный вариант любого из полипептидов, описанных в данном документе, характеризующийся по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичностью, например в пределах определенной области или в пределах всей последовательности, с последовательностью полипептида, описанного в данном документе, или встречающегося в природе полипептида. В некоторых случаях полипептид может характеризоваться по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% или более высокой) идентичностью с представляющим интерес белком.

Полипептиды, описанные в данном документе, могут быть составлены в виде композиции для любого из путей применения, описанных в данном документе. Композиции, раскрытые в данном документе, могут включать любое число или тип (например, классы) полипептидов, как, например, по меньшей мере приблизительно любое количество из 1 полипептида, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или более полипептидов. Подходящая концентрация каждого полипептида в композиции зависит от таких факторов, как эффективность, стабильность полипептида, количество различных полипептидов в композиции, состав и способы применения композиции. В некоторых случаях концентрация каждого полипептида в жидкой композиции составляет от приблизительно 0,1 нг/мл до приблизительно 100 мг/мл. В некоторых случаях концентрация каждого полипептида в твердой композиции составляет от приблизительно 0,1 нг/г до приблизительно 100 мг/г.

Способы получения полипептида являются стандартными в данной области техники. См., в целом, Smales & James (Eds.), Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press (2005); *и* Crommelin, Sindelar & Meibohm (Eds.), Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications, Springer (2013).

Способы получения полипептида предусматривают экспрессию в растительных клетках, хотя рекомбинантные белки также можно продуцировать с использованием клеток насекомых, дрожжей, бактерий, клеток млекопитающих или других клеток под контролем соответствующих промоторов. Векторы экспрессии млекопитающих могут содержать нетранскрибируемые элементы, такие как точка начала репликации, подходящий промотор и энхансер, и другие 5'- или 3'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, и 5'- или 3'-нетранслируемые последовательности, такие как необходимые участки связывания рибосомы, сайт полиаденилирования, донорный и акцепторный сайты сплайсинга, а также последовательности терминации. Последовательности ДНК, происходящие из генома

вируса SV40, например точку начала репликации SV40, ранний промотор, энхансер, сайты сплайсинга и полиаденилирования, можно применять для обеспечения других генетических элементов, требуемых для экспрессии гетерологичной последовательности ДНК. Подходящие векторы клонирования и экспрессии для применения в клетках-хозяевах, представляющих собой клетки бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих, описаны в Green & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012).

Для экспрессии и изготовления средства на основе рекомбинантного полипептида можно применять различные системы культивирования на основе клеток млекопитающих. Примеры систем экспрессии в клетках млекопитающих включают клетки CHO, клетки COS, линии клеток HeLA и BHK. Способы культивирования клеток-хозяев для получения терапевтических средств на основе белка описаны, например, в Zhou and Kantardjieff (Eds.), Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology), Springer (2014). Очистка белков описана в Franks, Protein Biotechnology: Isolation, Characterization, and Stabilization, Humana Press (2013); и в Cutler, Protein Purification Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press (2010). Составление терапевтических средств на основе белка описано в Meyer (Ed.), Therapeutic Protein Drug Products: Practical Approaches to formulation in the Laboratory, Manufacturing, and the Clinic, Woodhead Publishing Series (2012).

В некоторых случаях композиция для модификации растений содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Например, средство, описанное в данном документе, может представлять собой антитело, которое блокирует или усиливает активность и/или функцию компонента растения. Антитело может выступать в растении в качестве антагониста или агониста полипептида (например, фермента или клеточного рецептора). Получение и применение антител к целевому антигену известно из уровня техники. См., например, Zhiqiang An (Ed.), Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic, 1st Edition, Wiley, 2009, а также Greenfield (Ed.), Antibodies: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013, в отношении способов получения рекомбинантных антител, в том числе конструирования антител, применения вырожденных олигонуклеотидов, 5'-RACE, фагового дисплея и мутагенеза; тестирования и определения характеристик антител; фармакокинетики и фармакодинамики антител; очистки и хранения антител; а также методик скрининга и мечения.

B. Нуклеиновые кислоты

В некоторых случаях PMP, описанные в данном документе, включают гетерологичную нуклеиновую кислоту. Многочисленные нуклеиновые кислоты применимы в композициях для модификации растений и способах, описанных в данном документе. Композиции для модификации растений, раскрытые в данном документе, могут содержать любое число или тип (например, классы) нуклеиновых кислот (например, молекулу ДНК или молекулу РНК, например, мРНК, направляющую РНК (gRNA) или молекулу ингибирующей РНК (например, siRNA, shRNA или miRNA), или гибридную

молекулу ДНК-РНК), как, например, по меньшей мере приблизительно 1 класс или вариант нуклеиновой кислоты, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или больше классов или вариантов нуклеиновых кислот. Подходящая концентрация каждой нуклеиновой кислоты в композиции зависит от таких факторов, как эффективность, стабильность нуклеиновой кислоты, количество различных нуклеиновых кислот, состав и способы применения композиции. Примеры нуклеиновых кислот, применимых в данном документе, включают антисмысловую РНК, малую интерферирующую РНК, служащую субстратом для Dicer (dsiRNA), короткую интерферирующую РНК (siRNA), короткую шпилечную РНК (shRNA), микроРНК (miRNA), aiRNA (асимметричную интерферирующую РНК), пептидную нуклеиновую кислоту (PNA), морфолиновую нуклеиновую кислоту, запертую нуклеиновую кислоту (LNA), piwi-взаимодействующую РНК (piRNA), рибозим, дезоксирибозим (ДНКзим), аптамер (ДНК, РНК), кольцевую РНК (circRNA), направляющую РНК (gRNA) или молекулу ДНК. Нуклеиновая кислота может быть ассоциирована с другими факторами (например, полипептидами) каким-либо образом, известным из уровня техники, для обеспечения стабильности нуклеиновых кислот, например, устойчивости к действию нуклеазы. Например, нуклеиновые кислоты могут быть устойчивыми к действию нуклеазы при образовании комплексов с белками.

Композицию для модификации растений, содержащую нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе, можно приводить в контакт с растением в количестве и в течение времени, достаточных для: (a) достижения целевого уровня (например, предварительно определенного или порогового уровня) концентрации нуклеиновой кислоты и (b) модификации растения (например, повышения приспособленности растения).

(a) Нуклеиновые кислоты, кодирующие пептиды

В некоторых случаях композиция для модификации растений содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид. Длина нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, может составлять от приблизительно 10 до приблизительно 50000 нуклеотидов (нт.), от приблизительно 25 до приблизительно 100 нт., от приблизительно 50 до приблизительно 150 нт., от приблизительно 100 до приблизительно 200 нт., от приблизительно 150 до приблизительно 250 нт., от приблизительно 200 до приблизительно 300 нт., от приблизительно 250 до приблизительно 350 нт., от приблизительно 300 до приблизительно 500 нт., от приблизительно 10 до приблизительно 1000 нт., от приблизительно 50 до приблизительно 1000 нт., от приблизительно 100 до приблизительно 1000 нт., от приблизительно 1000 до приблизительно 2000 нт., от приблизительно 2000 до приблизительно 3000 нт., от приблизительно 3000 до приблизительно 4000 нт., от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нт., от приблизительно 5000 до приблизительно 6000 нт., от приблизительно 6000 до приблизительно 7000 нт., от приблизительно 7000 до приблизительно 8000 нт., от приблизительно 8000 до приблизительно 9000 нт., от приблизительно 9000 до приблизительно 10000 нт., от приблизительно 10000 до приблизительно 15000 нт., от

приблизительно 10000 до приблизительно 20000 нт., от приблизительно 10000 до приблизительно 25000 нт., от приблизительно 10000 до приблизительно 30000 нт., от приблизительно 10000 до приблизительно 40000 нт., от приблизительно 10000 до приблизительно 45000 нт., от приблизительно 10000 до приблизительно 50000 нт. или любой диапазон между ними.

Композиция для модификации растений может также содержать функционально активные варианты представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях вариант нуклеиновых кислот характеризуется по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичностью, например в пределах определенной области или в пределах всей последовательности, с последовательностью представляющей интерес нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях настоящее изобретение предусматривает функционально активный полипептид, кодируемый вариантом нуклеиновой кислоты, описанным в данном документе. В некоторых случаях функционально активный полипептид, кодируемый вариантом нуклеиновой кислоты, характеризуется по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичностью, например в пределах определенной области или в пределах всей последовательности, с последовательностью представляющего интерес полипептида или полипептидной последовательностью природного происхождения.

Определенные способы экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, могут предусматривать экспрессию в клетках, в том числе клетках насекомых, дрожжей, растений, бактерий или других клетках под контролем соответствующих промоторов. Векторы экспрессии могут содержать нетранскрибируемые элементы, такие как точка начала репликации, подходящий промотор и энхансер, и другие 5'- или 3'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, и 5'- или 3'-нетранслируемые последовательности, такие как необходимые участки связывания рибосомы, сайт полиаденилирования, донорный и акцепторный сайты сплайсинга, а также последовательности терминации. Последовательности ДНК, происходящие из генома вируса SV40, например точку начала репликации SV40, ранний промотор, энхансер, сайты сплайсинга и полиаденилирования, можно применять для обеспечения других генетических элементов, требуемых для экспрессии гетерологичной последовательности ДНК. Подходящие векторы клонирования и экспрессии для применения с клетками-хозяевами, представляющими собой клетки бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих описаны в Green et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

Генетическая модификация с применением рекомбинантных способов является общеизвестной в данной области техники. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая требуемый ген, может быть получена с использованием рекомбинантных

способов, известных в данной области техники, таких как, например, скрининг библиотек на основе клеток, экспрессирующих ген, путем получения гена из вектора, который, как известно, содержит его, или путем выделения непосредственно из клеток и тканей, содержащих его, с использованием стандартных методик. В качестве альтернативы представляющий интерес ген может быть получен синтетически, а не клонирован.

Экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, как правило, достигается с помощью функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес ген, с промотором, и включения данной конструкции в вектор экспрессии. Векторы экспрессии могут быть подходящими для репликации и экспрессии в бактериях. Векторы экспрессии также могут быть подходящими для репликации и интеграции в эукариотах. Типичные клонирующие векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, применимые для экспрессии требуемой последовательности нуклеиновой кислоты.

Дополнительные промоторные элементы, например энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области на 30-110 пар оснований (п. о.) выше сайта начала транскрипции, хотя, как было показано недавно, ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже сайта начала транскрипции. Промежуток между промоторными элементами зачастую является гибким, так что промоторная функция сохраняется, когда элементы инвертированы или перемещены друг относительно друга. В промоторе тимидинкиназы (tk) промежуток между промоторными элементами можно увеличить до 50 п. о. перед тем, как активность начинает снижаться. В зависимости от промотора, по-видимому, отдельные элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо для активации транскрипции.

Одним примером подходящего промотора является последовательность промотора гена немедленно-раннего ответа цитомегаловируса (CMV). Данная промоторная последовательность представляет собой последовательность сильного конститутивного промотора, способного управлять высокими уровнями экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ним. Другим примером подходящего промотора является фактор элонгации 1α (EF-1α). Однако также можно использовать другие последовательности конститутивных промоторов, в том числе без ограничения ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса рака молочной железы мыши (MMTV), промотор длинного концевого повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (HIV), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленно-ранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как без ограничения промотор гена актина, промотор гена миозина, промотор гена гемоглобина и промотор гена креатинкиназы.

В качестве альтернативы промотор может представлять собой индуцируемый промотор. Применение индуцируемого промотора предоставляет молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, если такая экспрессия является требуемой, или

выключение экспрессии, если экспрессия является нежелательной. Примеры индуцируемых промоторов включают без ограничения промотор гена металлотионина, промотор гена глюкокортикоидного рецептора, промотор гена прогестеронового рецептора и промотор гена устойчивости к тетрациклину.

Подлежащий введению вектор экспрессии также может содержать либо ген селективного маркера, либо репортерный ген, либо и то и другое для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые стараются подвергнуть трансфекции или инфицированию посредством вирусных векторов. В других аспектах селективный маркер может переноситься на отдельном фрагменте ДНК и применяться в процедуре котрансфекции. Как селектируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы подходящими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках хозяев. Применимые селектируемые маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как neo и т. п.

Репортерные гены можно применять для идентификации потенциально трансформированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. Репортерный ген обычно представляет собой ген, который отсутствует в реципиентном источнике или не экспрессируется в нем, и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется с помощью некоторого легко выявляемого свойства, например, ферментативной активности. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после того, как ДНК была введена в реципиентные клетки. Подходящие репортерные гены могут включать гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу, или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., FEBS Letters 479:79-82, 2000). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены с помощью известных методик или приобретены коммерческим путем. Обычно как промотор идентифицируется конструкция с минимальной 5'-фланкирующей областью, демонстрирующая наибольший уровень экспрессии репортерного гена. Такие промоторные области могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценки средств в отношении способности модулировать транскрипцию под управлением промотора.

В некоторых случаях организм может быть генетически модифицирован для изменения экспрессии одного или нескольких белков. Экспрессия одного или нескольких белков может быть модифицирована для определенного времени, например, стадии развития или дифференцировки организма. В одних случаях в настоящем изобретении предусмотрена композиция для изменения экспрессии одного или нескольких белков, например, белков, которые влияют на активность, структуру или функцию. Экспрессия одного или нескольких белков может быть ограничена определенным(-ыми) положением(-ями) или распространена по всему организму.

(b) Синтетическая мРНК

Композиция для модификации растений может содержать синтетическую молекулу мРНК, например, синтетическую молекулу мРНК, кодирующую полипептид. Синтетическая молекула мРНК может быть модифицированной, например, химически. Молекула мРНК может быть синтезирована химически или транскрибирована in vitro. Молекула мРНК может быть расположена в плазмиде, например, в вирусном векторе, бактериальном векторе или векторе экспрессии для эукариотических клеток. В некоторых примерах молекула мРНК может быть доставлена в клетки с помощью трансфекции, электропорации или трансдукции (например, аденовирусной или лентивирусной трансдукции).

В некоторых случаях представляющее интерес средство на основе модифицированной РНК, описанное в данном документе, имеет модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды. Такие модификации известны и описаны, например, в WO 2012/019168. Дополнительные модификации описаны, например, в WO 2015/038892; WO 2015/038892; WO 2015/089511; WO 2015/196130; WO 2015/196118 и WO 2015/196128 A2.

В некоторых случаях модифицированная РНК, кодирующая представляющий интерес полипептид, имеет одну или несколько концевых модификаций, например, 5'-кэп-структуру и/или поли-А-хвост (например, длиной от 100 до 200 нуклеотидов). 5'-кэп-структура может быть выбрана из группы, состоящей из CapO, Capl, ARCA, инозина, Nl-метилгуанозина, 2'-фторгуанозина, 7-деазагуанозина, 8-оксогуанозина, 2-аминогуанозина, LNA-гуанозина и 2-азидогуанозина. В некоторых случаях модифицированные РНК также содержат 5'-UTR, содержащую по меньшей мере одну последовательность Козак, и 3'-UTR. Такие модификации известны и описаны, например, в WO 2012/135805 и WO 2013/052523. Дополнительные концевые модификации описаны, например, в WO 2014/164253 и WO 2016/011306, WO 2012/045075 и WO 2014/093924. Химерные ферменты для синтеза кэппированных молекул РНК (например, модифицированной мРНК), которые могут содержать по меньшей мере одну химическую модификацию, описаны в WO 2014/028429.

В некоторых случаях модифицированная мРНК может быть подвергнута циклизации или конкатемеризации, чтобы получить молекулу, отвечающую требованиям трансляции, для облегчения взаимодействий между поли-А-связывающими белками и 5'-конец-связывающими белками. Механизм циклизации или конкатемеризации может осуществляться посредством по меньшей мере 3 различных путей: 1) химического, 2) ферментативного и 3) катализируемого рибозимами. Новообразованная 5'-/3'-связь может быть внутримолекулярной или межмолекулярной. Такие модификации описаны, например, в WO 2013/151736.

Способы получения и очистки модифицированных РНК известны и раскрыты в данной области техники. Например, модифицированные РНК получают с использованием только ферментативного синтеза при транскрипции in vitro (IVT). Способы получения полинуклеотидов на основе IVT известны в данной области техники и описаны в WO 2013/151666, WO 2013/151668, WO 2013/151663, WO 2013/151669, WO 2013/151670, WO

2013/151664, WO 2013/151665, WO 2013/151671, WO 2013/151672, WO 2013/151667 и WO 2013/151736. Способы очистки включают очистку РНК-транскрипта, содержащего поли-А-хвост, путем приведения образца в контакт с поверхностью, связанной с совокупностью тимидинов или их производных и/или с совокупностью урацилов или их производных (поли-T/U) при таких условиях, что РНК-транскрипт связывается с поверхностью, и элюирования очищенного РНК-транскрипта с поверхности (WO 2014/152031); применение ионо- (например, анионо-) обменной хроматографии, которая позволяет разделять более длинные молекулы РНК, длина которых составляет вплоть до 10000 нуклеотидов, посредством масштабируемого способа (WO 2014/144767); и воздействие на образец модифицированной мРНК с помощью обработки ДНКазой (WO 2014/152030).

Составы на основе модифицированных РНК известны и описаны, например, в WO 2013/090648. Например, состав может представлять собой без ограничения наночастицы, микросферы на основе сополимера молочной и гликолевой кислоты (PLGA), липидоиды, липоплекс, липосому, полимеры, углеводы (в том числе простые сахара), катионные липиды, фибриновый гель, фибриновый гидрогель, фибриновый клей, фибриновый герметик, фибриноген, тромбин, быстро элиминируемые липидные наночастицы (reLNP) и их комбинации.

Модифицированные РНК, кодирующие полипептиды, связанных с областью заболеваний человека, антителами, вирусами, и различные условия in vivo известны и раскрыты, к примеру, в таблице 6 из международной публикации №№ WO 2013/151666, WO 2013/151668, WO 2013/151663, WO 2013/151669, WO 2013/151670, WO 2013/151664, WO 2013/151665, WO 2013/151736; таблицах 6 и 7 из международной публикации № WO 2013/151672; таблицах 6, 178 и 179 из международной публикации № WO 2013/151671; таблицах 6, 185 и 186 из международной публикации № WO 2013/151667. Все из вышеизложенного можно синтезировано в виде полинуклеотида IVT, химерного полинуклеотида или кольцевого нуклеотида, и каждый из них может включать один или несколько модифицированных нуклеотидов или концевых модификаций.

(c) Ингибирующая РНК

В некоторых случаях композиция для модификации растений содержит молекулу ингибирующей РНК, например, которая действует посредством пути РНК-интерференции (RNAi). В некоторых случаях молекула ингибирующей РНК снижает уровень экспрессии гена в растении и/или снижает уровень белка в растении. В некоторых случаях молекула ингибирующей РНК подавляет экспрессию гена растения. Например, молекула ингибирующей РНК может предусматривать короткую интерферирующую РНК, короткую шпилечную РНК и/или микроРНК, которые целенаправленно воздействуют на ген в растении. Определенные молекулы РНК могут подавлять экспрессию генов посредством биологического процесса РНК-интерференции (RNAi). Молекулы для RNAi включают РНК или РНК-подобные структуры, как правило, содержащие 15-50 пар оснований (например, приблизительно 18-25 пар оснований) и имеющие последовательность нуклеиновых оснований, идентичную (комплементарную) или почти

идентичную (практически полностью комплементарную) кодирующей последовательности в экспрессируемом целевом гене в клетке. Молекулы RNAi включают без ограничения: малые интерферирующие РНК, служащие субстратом для Dicer (dsiRNA), короткие интерферирующие РНК (siRNA), двухнитевые РНК (dsRNA), короткие шпилечные РНК (shRNA), меродуплексы, субстраты для dicer и мультивалентные интерферирующие РНК (патенты США №№ 8084599, 8349809, 8513207 и 9200276). shRNA представляет собой молекулу РНК, содержащую шпилечный поворот, которая обеспечивает снижение экспрессии целевых генов посредством RNAi. shRNA могут доставляться в клетки в виде плазмид, например, вирусных или бактериальных векторов, например, с помощью трансфекции, электропорации или трансдукции). МикроРНК представляет собой некодирующую молекулу РНК, длина которой, как правило, составляет приблизительно 22 нуклеотида. MiRNA связываются с целевыми сайтами на молекулах мРНК и приводят к сайленсингу мРНК, например, вызывая расщепление мРНК, дестабилизацию мРНК или подавление трансляции мРНК. В некоторых случаях молекула ингибирующей РНК снижает уровень и/или активность отрицательного регулятора функции. В других случаях молекула ингибирующей РНК снижает уровень и/или активность ингибитора положительного регулятора функции. Молекула ингибирующей РНК может быть синтезирована химически или транскрибирована in vitro.

В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой ДНК, РНК или PNA. В некоторых случаях РНК представляет собой ингибирующую РНК. В некоторых случаях ингибирующая РНК подавляет экспрессию генов в растении. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой мРНК, модифицированную мРНК или молекулу ДНК, которые повышают экспрессию фермента (например, метаболической рекомбиназы, геликазы, интегразы, РНКазы, ДНКазы или белка убиквитинирования), порообразующего белка, сигнального лиганда, проникающего в клетку пептида, транскрипционного фактора, рецептора, антитела, нанотела, белка для редактирования генов (например, системы CRISPR-Cas, TALEN или "цинкового пальца"), рибопротеина, белкового аптамера или шаперона в растении. В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой мРНК, модифицированную мРНК или молекулу ДНК, которые повышают экспрессию фермента (например, метаболического фермента, фермента-рекомбиназы, фермента-геликазы, фермента-интегразы, фермента-РНКазы, фермента-ДНКазы или белка убиквитинирования), порообразующего белка, сигнального лиганда, проникающего в клетку пептида, транскрипционного фактора, рецептора, антитела, нанотела, белка для редактирования генов (например, системы CRISPR-Cas, TALEN или "цинкового пальца"), рибопротеина, белкового аптамера или шаперона. В некоторых случаях повышение экспрессии у растения представляет собой повышение экспрессии на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, экспрессией в необработанном растении). В некоторых случаях повышение экспрессии у растения

представляет собой повышение экспрессии в приблизительно 2 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 10 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 25 раз, приблизительно 50 раз, приблизительно 75 раз или приблизительно 100 раз или больше по сравнению с референтным уровнем (например, экспрессией в необработанном растении).

В некоторых случаях нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловую РНК, siRNA, shRNA, miRNA, aiRNA, PNA, морфолиновую нуклеиновую кислоту, LNA, piRNA, рибозим, ДНКзим, аптамер (ДНК, РНК), circRNA, gRNA или молекулу ДНК (например, антисмысловой полинуклеотид) для снижения экспрессии, например, фермента (метаболического фермента, фермента-рекомбиназы, фермента-хеликазы, фермента-интегразы, фермента-РНКазы, фермента-ДНКазы, фермента-полимеразы, белка убиквитинирования, фермента контроля содержания супероксида или фермента, отвечающего за продукцию энергии), транскрипционного фактора, секреторного белка, структурного фактора (актина, кинезина или тубулина), рибопротеина, белкового аптамера, шаперона, рецептора, сигнального лиганда или транспортера в растении. В некоторых случаях снижение экспрессии у растения представляет собой снижение экспрессии на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более 100% по сравнению с референтным уровнем (например, экспрессией в необработанном растении). В некоторых случаях снижение экспрессии у растения представляет собой снижение экспрессии в приблизительно 2 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 10 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 25 раз, приблизительно 50 раз, приблизительно 75 раз или приблизительно 100 раз или больше по сравнению с референтным уровнем (например, экспрессией в необработанном растении).

Молекулы для RNAi содержат последовательность, практически полностью комплементарную или полностью комплементарную всему целевому гену или его фрагменту. Молекулы для RNAi могут быть комплементарны последовательностям на границе между интронами и экзонами для предотвращения созревания новообразованных ядерных РНК-транскриптов специфических генов до мРНК для транскрипции. Молекулы для RNAi, комплементарные специфическим генам, могут гибридизироваться с мРНК для целевого гена и предотвращать его трансляцию. Антисмысловая молекула может представлять собой ДНК, РНК или их производное или гибрид. Примеры таких производных молекул включают без ограничения пептидную нуклеиновую кислоту (PNA) и молекулы на основе фосфотиоатных связей, такие как дезоксирибонуклеиновый гуанидин (DNG) или рибонуклеиновый гуанидин (RNG).

Молекулы для RNAi могут обеспечиваться в виде "готовой к применению" РНК, синтезированной in vitro, или в виде антисмыслового гена, трансфицируемого в клетки, который приведет к образованию молекул для RNAi после транскрипции. Гибридизация с мРНК приводит к разрушению гибридизированной молекулы под действием РНКазы H и/или подавлению образования трансляционных комплексов. И то и другое приводит к

невозможности продуцировать продукт исходного гена.

Длина молекулы для RNAi, которая гибридизируется с представляющим интерес транскриптом, может составлять примерно 10 нуклеотидов, от приблизительно 15 до 30 нуклеотидов или приблизительно 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более нуклеотидов. Степень идентичности антисмысловой последовательности с целевым транскриптом может составлять по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%.

Молекулы для RNAi также могут содержать выступающие концы, т. е. обычно неспаренные выступающие нуклеотиды, которые непосредственно не задействованы в двойной спиральной структуре, в норме образуемую коровыми последовательностями пары смысловой и антисмысловой нити, определенной в данном документе. Молекулы для RNAi могут содержать 3'- и/или 5'-выступающие концы из приблизительно 1-5 оснований независимо на каждой из смысловых нитей и антисмысловых нитей. В некоторых случаях как смысловая нить, так и антисмысловая нить содержат 3'- и 5'-выступающие концы. В некоторых случаях один или несколько нуклеотидов 3'-выступающего конца одной нити образуют пары оснований с одним или несколькими нуклеотидами 5'-выступающего конца другой нити. В других случаях один или несколько нуклеотидов 3'-выступающего конца одной нити не образуют пары оснований с одним или несколькими нуклеотидами 5'-выступающего конца другой нити. Смысловая и антисмысловая нити молекулы для RNAi могут содержать одинаковое или разное количество нуклеотидных оснований. Антисмысловая и смысловая нити могут образовывать дуплекс, при этом только 5'-конец имеет тупой конец, только 3'-конец имеет тупой конец, как 5'-, так и 3'-концы заканчиваются тупым концом, или ни 5'-, ни 3'-конец не заканчиваются тупым концом. В другом случае один или несколько нуклеотидов в выступающем конце содержат тиофосфат, фосфотиоат, дезоксинуклеотидный инвертированный (связанный в направлении от 3' до 3') нуклеотид или представляют собой модифицированный рибонуклеотид или дезоксинуклеотид.

Молекулы малой интерферирующей РНК (siRNA) содержат нуклеотидную последовательность, которая является идентичной участку от приблизительно 15 до приблизительно 25 смежных нуклеотидов целевой мРНК. В некоторых случаях последовательность siRNA начинается динуклеотидом AA, имеет содержание GC, составляющее приблизительно 30-70% (приблизительно 30-60%, приблизительно 40-60% или приблизительно 45%-55%), и не характеризуется высоким процентом идентичности с любой нуклеотидной последовательностью, отличной от мишени в геноме, в который она подлежит введению, например, как определено с помощью стандартного поиска BLAST.

siRNA и shRNA сходны с промежуточными соединениями в пути процессинга генов эндогенных микроРНК (miRNA) (Bartel, Cell 116:281-297, 2004). В некоторых случаях siRNA могут функционировать в качестве miRNA и наоборот (Zeng et al., Mol. Cell 9:1327-1333, 2002; Doench et al., Genes Dev. 17:438-442, 2003). Экзогенные siRNA снижают экспрессию мРНК с затравочной областью, комплементарной siRNA

(Birmingham et al., Nat. Methods 3:199-204, 2006). Несколько целевых сайтов в пределах 3'-UTR приводят к более сильному снижению экспрессии (Doench et al., Genes Dev. 17:438-442, 2003).

Известные эффективные последовательности siRNA и когнатные связывающие сайты также хорошо представлены в соответствующей литературе. Молекулы для RNAi быстро разрабатывают и получают с помощью технологий, известных в данной области техники. Помимо этого, существуют компьютерные средства, которые повышают вероятность обнаружения эффективных и специфических мотивов последовательностей (Pei et al., Nat. Methods 3(9):670-676, 2006; Reynolds et al., Nat. Biotechnol. 22(3):326-330, 2004; Khvorova et al., Nat. Struct. Biol. 10(9):708-712, 2003; Schwarz et al., Cell 115(2):199-208, 2003; Ui-Tei et al., Nucleic Acids Res. 32(3):936-948, 2004; Heale et al., Nucleic Acids Res. 33(3):e30, 2005; Chalk et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 319(1):264-274, 2004; и Amarzguioui et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 316(4):1050-1058, 2004).

Молекула для RNAi модулирует экспрессию РНК, кодируемую геном. Поскольку несколько генов могут характеризоваться некоторой степенью гомологии последовательностей друг с другом, в некоторых случаях молекула для RNAi может быть сконструирована таким образом, чтобы целенаправленно воздействовать на класс генов с достаточной гомологией последовательностей. В некоторых случаях молекула для RNAi может содержать последовательность, которая характеризуется комплементарностью с последовательностями, которые являются общими для различных генов-мишеней или являются уникальными для специфического гена-мишени. В некоторых случаях молекула для RNAi может быть сконструирована таким образом, чтобы целенаправленно воздействовать на консервативные области последовательности РНК с гомологией между несколькими генами, тем самым целенаправленно воздействуя на несколько генов в семействе генов (например, различные изоформы генов, сплайс-варианты, мутантные гены и т. д.). В некоторых случаях молекула для RNAi может быть сконструирована для целенаправленного воздействия на последовательность, которая является уникальной для специфической последовательности РНК одного гена.

Молекула ингибирующей РНК может быть модифицированной, например, содержать модифицированные нуклеотиды, например, 2'-фтор, 2'-О-метил, 2'-дезокси, незамкнутую нуклеиновую кислоту, 2'-гидрокси, фосфотиоат, 2'-тиоуридин, 4'-тиоуридин, 2'-дезоксиуридин. Не ограничиваясь теорией, полагают, что такие модификации могут повышать устойчивость к нуклеазам и/или стабильность в сыворотке крови или снижать иммуногенность.

В некоторых случаях молекулу для RNAi связывают с полимером для доставки с помощью физиологически неустойчивой связи или линкера. Физиологически неустойчивый линкер выбирают так, чтобы он подвергался химической трансформации (например, расщеплению), находясь в определенных физиологических условиях (например, дисульфидная связь расщепляется в восстанавливающей среде цитоплазмы клетки). Высвобождение молекулы из полимера путем расщепления физиологически

неустойчивой связи облегчает взаимодействие молекулы с подходящими клеточными компонентами для обеспечения ее активности.

Конъюгат молекула для RNAi-полимер может быть образован путем образования ковалентной связи молекулы с полимером. Полимер полимеризуют или модифицируют так, чтобы он содержал реакционноспособную группу A. Молекулу для RNAi также полимеризуют или модифицируют так, чтобы она содержала реакционноспособную группу B. Реакционноспособные группы A и B выбирают таким образом, что они могут связываться посредством обратимой ковалентной связи с использованием способов, известных в данной области техники.

Конъюгацию молекулы для RNAi с полимером можно выполнять в присутствии избытка полимера. Поскольку молекула для RNAi и полимер могут иметь разный заряд во время конъюгации, наличие избытка полимера может приводить к снижению или устранению агрегации конъюгата. В качестве альтернативы можно применять избыток полимера-носителя, такого как поликатион. Избыток полимера может быть удален из конъюгированного полимера перед введением конъюгата. В качестве альтернативы избыток полимера может быть введен совместно с конъюгатом.

Получение и применение ингибирующих средств на основе некодирующей РНК, такой как рибозимы, РНКаза P, siRNA и miRNA, также известно в данной области техники, например, как описано в Sioud, RNA Therapeutics: Function, Design, and Delivery (Methods in Molecular Biology). Humana Press (2010).

(d) Редактирование генов

Композиции для модификации растений, описанные в данном документе, могут содержать компонент системы редактирования генов. Например, средство может вносить изменение (например, вставку, делецию (например, нокаут), транслокацию, инверсию, точечную мутацию или другую мутацию) в ген в растении. Иллюстративные системы редактирования генов включают нуклеазы с "цинковыми пальцами" (ZFN), нуклеазы на основе эффектора, подобного активаторам транскрипции (TALEN), и систему коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR). Способы на основе ZFN, TALEN и CRISPR описаны, например, в Gaj et al., Trends Biotechnol. 31(7):397-405, 2013.

В типичной системе CRISPR/Cas эндонуклеаза направлена на целевую нуклеотидную последовательность (например, сайт в геноме, который подлежит редактированию последовательности) с помощью специфических в отношении последовательности некодирующих направляющих РНК, которые целенаправленно воздействуют на одно- или двухнитевые последовательности ДНК. Были идентифицированы три класса (I-III) систем CRISPR. В системах CRISPR II класса используется одна эндонуклеаза Cas (вместо нескольких белков Cas). Одна система CRISPR II класса включает эндонуклеазу Cas II типа, такую как Cas9, CRISPR-РНК (crRNA) и транс-активирующую crRNA (tracrRNA). crRNA содержит направляющую РНК, т. е. обычно последовательность РНК из приблизительно 20 нуклеотидов, которая

соответствует целевой последовательности ДНК. crRNA также содержит область, которая связывается с tracrRNA с образованием частично двухнитевой структуры, которая расщепляется РНКазой III, что приводит к образованию гибрида crRNA/tracrRNA. РНК выступают в качестве направляющих последовательностей, чтобы направлять белки Cas для осуществления сайленсинга специфических последовательностей ДНК/РНК, в зависимости от спейсерной последовательности. См., например, Horvath et al., Science 327:167-170, 2010; Makarova et al., Biology Direct 1:7, 2006; Pennisi, Science 341:833-836, 2013. Последовательность целевой ДНК обычна должна прилегать к мотиву, прилегающему к протоспейсеру (PAM), который является специфическим для рассматриваемой эндонуклеазы Cas; однако, последовательности PAM встречаются по всему рассматриваемому геному. Эндонуклеазы CRISPR, идентифицированные у различных прокариотических видов, обладают уникальными требованиями к последовательностям PAM; примеры последовательностей PAM включают 5'-NGG (SEQ ID NO: 1) (Streptococcus pyogenes), 5'-NNAGAA (SEQ ID NO: 2) (Streptococcus thermophilus CRISPR1), 5'-NGGNG (SEQ ID NO: 3) (Streptococcus thermophilus CRISPR3) и 5'-NNNGATT (SEQ ID NO: 4) (Neisseria meningitidis). Некоторые эндонуклеазы, например, эндонуклеазы Cas9, ассоциируются с сайтами PAM с высоким содержанием G, например, 5'-NGG (SEQ ID NO: 1), и они осуществляют расщепление с образованием тупых концов целевой ДНК в положении на 3 нуклеотида выше (в направлении 5'-конца) от сайта PAM. Другая система CRISPR II класса включает эндонуклеазу Cpf1 V типа, которая имеет меньший размер, чем Cas9; примеры включают AsCpf1 (из Acidaminococcus sp.) и LbCpf1 (из Lachnospiraceae sp.). Cpf1-ассоциированные матрицы CRISPR подвергаются процессингу в зрелые crRNA без потребности в tracrRNA; другими словами, в случае системы Cpf1 для расщепления целевой последовательности ДНК требуется только нуклеаза Cpf1 и crRNA. Эндонуклеазы Cpf1 ассоциируются с сайтами PAM с высоким содержанием T, например, 5'-TTN (SEQ ID NO: 5). Cpf1 также может распознавать PAM-мотив 5'-CTA (SEQ ID NO: 6). Cpf1 расщепляет целевую ДНК посредством введения смещенного или ступенчатого двухнитевого разрыва с образованием 5'-выступающего конца длиной 4 или 5 нуклеотидов, например, посредством расщепления целевой ДНК с образованием смещенного или ступенчатого разреза, охватывающего 5 нуклеотидов, расположенного на 18 нуклеотидов ниже сайта PAM (в направлении 3'-конца от него) на кодирующей нити и на 23 нуклеотида ниже сайта PAM на комплементарной нити; при этом выступающий конец длиной 5 нуклеотидов, который образуется в результате такого смещенного расщепления, обеспечивает возможность более точного редактирования генома посредством вставки ДНК за счет гомологичной рекомбинации по сравнению со вставкой в ДНК, подвергнутой расщеплению с образованием тупых концов. См., например, Zetsche et al., Cell 163:759-771, 2015.

Для целей редактирования генома матрицы CRISPR могут быть сконструированы таким образом, чтобы содержать одну или несколько последовательностей направляющей РНК, соответствующих требуемой целевой последовательности ДНК; см., например, Cong

et al., Science 339:819-823, 2013; Ran et al., Nature Protocols 8:2281-2308, 2013. Чтобы произошло расщепление ДНК Cas9 требуется последовательность gRNA из по меньшей мере приблизительно 16 или 17 нуклеотидов; при этом для достижения поддающегося выявлению расщепления ДНК в случае Cpf1 необходима последовательность gRNA из по меньшей мере приблизительно 16 нуклеотидов. На практике последовательности направляющей РНК обычно конструируют таким образом, чтобы их длина составляла 17-24 нуклеотида (например, 19, 20 или 21 нуклеотид) и они были комплементарны последовательности целевого гена или нуклеиновой кислоты. Специализированные генераторы и алгоритмы для создания gRNA являются коммерчески доступными для применения в разработке эффективных направляющих РНК. Редактирование генов также достигалось с помощью химерных одиночных направляющих РНК (sgRNA), сконструированной (синтетической) одиночной молекулы РНК, которая имитирует встречающийся в природе комплекс crRNA-tracrRNA и содержит как tracrRNA (для связывания нуклеазы), так и по меньшей мере одну crRNA (для направления нуклеазы к последовательности, которая служит мишенью для редактирования). Также было продемонстрировано, что химически модифицированные sgRNA являются эффективными в редактировании генома; см., например, Hendel et al., Nature Biotechnol. 985-991, 2015. В некоторых случаях гетерологичное средство, модифицирующее растения, содержит рибонуклеопротеиновый (RNP) комплекс, содержащий одну или несколько молекул РНК, например, gRNA или sgRNA, и один или несколько РНК-связывающих белков, например, эндонуклеазу, например, эндонуклеазу Cas (например, эндонуклеазу Cas9).

В то время как Cas9 дикого типа приводит к образованию двухнитевых разрывов (DSB) в специфических последовательностях ДНК, которые служат мишенью для gRNA, доступен целый ряд эндонуклеаз CRISPR с модифицированными функциональными свойствами, например: никазный вариант Cas9 приводит к образованию только однонитевого разрыва; каталитически неактивная Cas9 (dCas9) не разрезает целевую ДНК, однако препятствует транскрипции за счет стерического затруднения. dCas9 может быть дополнительно слита с эффектором для обеспечения репрессии (CRISPRi) или активации (CRISPRa) экспрессии целевого гена. Например, Cas9 может быть слита с транскрипционным репрессором (например, доменом KRAB) или транскрипционным активатором (например, слиянием dCas9-VP64). Каталитически неактивная Cas9 (dCas9), слитая с нуклеазой FokI (dCas9-FokI), можно использовать для образования DSB в целевых последовательностях, гомологичных двум gRNA. См., например, многочисленные плазмиды CRISPR/Cas9, раскрытые в репозитории Addgene (Addgene, 75 Sidney St., Suite 550A, Кембридж, Массачусетс 02139; addgene.org/crispr/) и публично доступные в нем. Двойная никаза Cas9, которая вводит два отдельные двухнитевые разрывы, каждый из которых направляется отдельной направляющей РНК, описана как достигающая более точного редактирования генома в Ran et al., Cell 154:1380-1389, 2013.

Технология CRISPR для редактирования генов эукариот раскрыта в публикациях заявки на патент США US 2016/0138008 A1 и US 2015/0344912 A1 и в патентах США

8697359, 8771945, 8945839, 8999641, 8993233, 8895308, 8865406, 8889418, 8871445, 8889356, 8932814, 8795965 и 8906616. Эндонуклеаза Cpf1 и соответствующие направляющие РНК и сайты PAM раскрыты в публикации заявки на патент США 2016/0208243 A1.

В некоторых случаях требуемая модификация генома включает гомологичную рекомбинацию, при этом один или несколько двухнитевых разрывов ДНК в целевой нуклеотидной последовательности образуются под действием направляемой РНК нуклеазы и направляющей(-их) РНК с последующей репарацией разрыва(-ов) с использованием механизма гомологичной рекомбинации (репарации, направляемой гомологией). В таких случаях в клетку или субъект вводится донорная матрица, которая кодирует требуемую нуклеотидную последовательность, подлежащую вставке или нокину в двухнитевой разрыв; примеры подходящих матриц включают однонитевые ДНК-матрицы и двухнитевые ДНК-матрицы (например, связанные с полипептидом, описанным в данном документе). Как правило, донорная матрица, кодирующая замену нуклеотидов в пределах области, составляющей меньше приблизительно 50 нуклеотидов, вводится в виде однонитевой ДНК; более крупные донорные матрицы (например, больше 100 нуклеотидов) часто вводятся в виде плазмид из двухнитевой ДНК. В некоторых случаях донорная матрица вводится в клетку или субъекта в количестве, которое является достаточным для достижения требуемой репарации, направляемой гомологией, но она не сохраняется в клетке или у субъекта после заданного периода времени (например, после одного или нескольких циклов клеточного деления). В некоторых случаях донорная матрица имеет коровую нуклеотидную последовательность, которая отличается от целевой нуклеотидной последовательности (например, гомологичной эндогенной геномной области) на по меньшей мере 1, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50 или больше нуклеотидов. Данная коровая последовательность фланкирована плечами гомологии или областями высокой идентичности последовательности с целевой нуклеотидной последовательности; в некоторых случаях области высокой идентичности содержат по меньшей мере 10, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 150, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500, по меньшей мере 600, по меньшей мере 750 или по меньшей мере 1000 нуклеотидов с каждой стороны коровой последовательности. В некоторых случаях, если донорная матрица находится в виде однонитевой ДНК, то коровая последовательность фланкирована плечами гомологии, содержащими по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80 или по меньшей мере 100 нуклеотидов с каждой стороны коровой последовательности. В случаях, если донорная матрица находится в виде двухнитевой ДНК, то коровая последовательность фланкирована плечами гомологии, содержащими по меньшей мере 500, по меньшей мере 600, по меньшей мере 700, по меньшей мере 800, по меньшей мере 900 или по меньшей мере 1000 нуклеотидов с каждой

стороны коровой последовательности. В одном случае два отдельные двухнитевые разрывы вводят в клетку или целевую нуклеотидную последовательность субъекта с помощью двойной никазы Cas9 (см. Ran et al., Cell 154:1380-1389, 2013) с последующей доставкой донорной матрицы.

В некоторых случаях композиция содержит gRNA и нацеленную нуклеазу, например, Cas9, например, Cas9 дикого типа, никазу Cas9 (например, Cas9 D10A), неактивную форму Cas9 (dCas9), eSpCas9, Cpf1, C2C1 или C2C3, или нуклеиновую кислоту, кодирующую такую нуклеазу. Выбор нуклеазы и gRNA определяется тем, представляет ли собой целевая мутация делецию, замену или добавление нуклеотидов, например, делецию, замену или добавление нуклеотидов в целевую последовательность. Слияния каталитически неактивной эндонуклеазы, например, неактивной формы Cas9 (dCas9, например, D10A; H840A), связанной со всей или частью (например, биологически активной частью) (одного или нескольких) эффекторных доменов, приводят к образованию химерных белков, которые могут быть связаны с полипептидом для направления композиции к специфическим сайтам ДНК с помощью одной или нескольких последовательностей РНК (sgRNA) для модулирования активности и/или экспрессии одной или нескольких целевых последовательностей нуклеиновых кислот. В некоторых случаях, gRNA и нацеленная нуклеаза вводятся в виде рибонуклеопротеинового комплекса (RNP).

В некоторых случаях средство предусматривает направляющую РНК (gRNA) для применения в системе CRISPR для редактирования генов. В некоторых случаях средство предусматривает нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN) или мРНК, кодирующую ZFN, которая целенаправленно воздействует (например, расщепляет) на последовательность нуклеиновой кислоты (например, последовательность ДНК) гена в растении. В некоторых случаях средство предусматривает TALEN или мРНК, кодирующую TALEN, которая целенаправленно воздействует (например, расщепляет) на последовательность нуклеиновой кислоты (например, последовательность ДНК) в гене в растении.

Например, gRNA может использоваться в системе CRISPR для конструирования изменения в гене в растении. В других примерах для конструирования изменения в гене в растении можно использовать ZFN и/или TALEN. Иллюстративные изменения включают вставки, делеции (например, нокауты), транслокации, инверсии, точечные мутации или другие мутации. Изменение может быть введено в ген в клетке, например, in vitro, ex vivo или in vivo. В некоторых примерах изменение повышает уровень и/или активность гена в растении. В других примерах изменение снижает уровень и/или активность (например, приводит к нокдауну или нокауту) гена в растении. В еще одном примере изменение исправляет дефект (например, мутацию, вызывающую дефект) гена в растения.

В некоторых случаях система CRISPR используется для редактирования (например, добавления или удаления пары оснований) целевого гена в растении. В других случаях система CRISPR применяется для введения преждевременного стоп-кодона, например, за счет этого снижается экспрессия целевого гена. В еще одних случаях

система CRISPR применяется для выключения целевого гена обратимым образом, например, аналогично РНК-интерференции. В некоторых случаях система CRISPR применяется для направления Cas к промотору гена, за счет чего РНК-полимераза блокируется стерическим образом.

В некоторых случаях может быть создана система CRISPR для редактирования гена в растении с использованием технологии, описанной, например, в публикации заявки на патент США № 20140068797, Cong, Science 339: 819-823, 2013; Tsai, Nature Biotechnol. 32:6 569-576, 2014; патентах США №№ 8871445; 8865406; 8795965; 8771945 и 8697359.

В некоторых случаях методику CRISPR-интерференции (CRISPRi) можно применять для репрессии транскрипции специфических генов в растении. В случае CRISPRi сконструированный белок Cas9 (например, нулевая нуклеаза dCas9 или слитый белок dCas9, например, слияние dCas9-KRAB или dCas9-SID4X) может спариваться со специфической в отношении последовательности направляющей РНК (sgRNA). Комплекс Cas9-gRNA может блокировать РНК-полимеразу, тем самым препятствуя элонгации транскрипта. Данный комплекс также может блокировать инициацию транскрипции путем препятствования связыванию с транскрипционными факторами. Способ CRISPRi является специфическим с минимальными нецелевыми эффектами и мультиплексным, например, может приводить к одновременной репрессии нескольких генов (например, с помощью нескольких gRNA). Кроме того, способ CRISPRi обеспечивает обратимую репрессию генов.

В некоторых случаях активация гена, опосредованная CRISPR (CRISPRa), может использоваться для активации транскрипции гена в растении. В случае методики CRISPRa слитые белки dCas9 обеспечивают рекрутинг транскрипционных активаторов. Например, dCas9 можно слить с полипептидами (например, доменами активации), такими как VP64 или домен активации p65 (p65D), и использовать совместно с sgRNA (например, одиночной sgRNA или несколькими sgRNA) для активации гена или генов в растении. Использование нескольких sgRNA может обеспечивать рекрутинг нескольких активаторов - это может повышать эффективности активации. Можно применять различные домены активации и один или несколько доменов активации. В дополнение к конструированию dCas9 для рекрутинга активаторов также можно конструировать sgRNA для рекрутинга активаторов. Например, РНК-аптамеры могут быть встроены в sgRNA для рекрутинга белков (например, доменов активации), таких как VP64. В некоторых примерах для активации транскрипции можно применять систему посредников синергетической активации (SAM). В случае SAM аптамеры MS2 добавляют к sgRNA. MS2 обеспечивает рекрутинг белка оболочки MS2 (MCP), слитого с p65AD и фактором теплового шока 1 (HSF1).

Методики CRISPRi и CRISPRa описаны более подробно, например, в Dominguez et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 17:5-15, 2016, включенном в данном документе посредством ссылки. Кроме того, для модуляции гена в растении можно использовать опосредованные dCas9 эпигенетические модификации и одновременную активацию и репрессию с

использованием систем CRISPR, как описано в Dominguez et al.

V. Наборы

В настоящем изобретении также представлен набор для модификации растений, где набор включает контейнер, содержащий композицию для модификации растений, описанную в данном документе. Набор может дополнительно содержать инструкции по применению или доставке (например, в растение) композиции для модификации растений, чтобы модифицировать растение в соответствии со способом по настоящему изобретению. Специалисту в данной области будет понятно, что инструкции по применению композиции для модификации растений в способах по настоящему изобретению могут представлять собой инструкции в любой форме. Такие инструкции включают без ограничения текстовые инструкции (такие как этикетка, буклет, брошюра), аудиоинструкции (например, представленные на аудиокассете или CD) или видеоинструкции (например, представленные на видеокассете или DVD).

ПРИМЕРЫ

Далее представлены примеры способов по настоящему изобретению. Следует понимать, что на практике возможно осуществление различных других вариантов осуществления с учетом общего описания, приведенного выше.

Оглавление (примеры)

Пример 1.	**Выделение пакетов-мессенджеров растений из растений.**
Пример 2.	Получение очищенных пакетов-мессенджеров растений (PMP).
Пример 3.	**Определение характеристик пакетов-мессенджеров растений.**
Пример 4.	**Определение характеристик стабильности пакетов-мессенджеров растений.**
Пример 5.	**Загрузка PMP полезным грузом.**
Пример 6.	Модификация растения посредством PMP-опосредованной доставки плазмид in planta.
Пример 7.	Модификация растения посредством PMP-опосредованной доставки коротких нуклеиновых кислот.
Пример 8.	Модификация растения посредством PMP-опосредованной доставки плазмид в протопласты.
Пример 9.	**Получение PMP из фруктового сока, полученного с помощью измельчения, с применением ультрацентрифугирования и очистки в градиенте сахарозы.**
Пример 10.	Получение PMP из фруктового сока, полученного прессованием на сетке, с применением ультрацентрифугирования и очистки в градиенте сахарозы.
Пример 11.	Получение PMP с использованием ультрацентрифугирования и эксклюзионной хроматографии.

Пример 12.	Крупномасштабное получение PMP с использованием фильтрации в тангенциальном потоке и эксклюзионной хроматографии в комбинации с EDTA/диализом для снижения содержания контаминантов.
Пример 13.	Получение PMP из среды для культивирования клеток растений.
Пример 14.	Поглощение PMP растительными клетками.
Пример 15.	Поглощение PMP растениями.
Пример 16.	Обработка проростков Arabidopsis thaliana с помощью PMP из грейпфрута, загруженных DOX.
Пример 17.	Поглощение обработанных пектиназой PMP ростками люцерны.
Пример 18.	Модификация PMP с использованием катионных липидов.
Пример 19.	Модификация растения посредством PMP-опосредованной доставки gRNA.

Пример 1. Выделение пакетов-мессенджеров растений из растений

В этом примере описано выделение неочищенных пакетов-мессенджеров растений (PMP) из различных растительных источников, включая апопласт листа, апопласт семени, корень, плод, вегетативную часть, пыльцу, флоэму, ксилемный сок и среду для культивирования растительных клеток.

Схема эксперимента

a) Выделение PMP из апопласта листьев Arabidopsis thaliana

Семена растения рода Arabidopsis (Arabidopsis thaliana Col-0) подвергали поверхностной стерилизации с помощью 50% отбеливателя и высевали на среду 0,53 Мурасиге-Скуга, содержащую 0,8% агара. Семена подвергали яровизации в течение 2 дней при 4°C перед перемещением в условия короткого дня (9-часовые дни, 22°C, 150 мкЭм$^{-2}$). Через 1 неделю проростки переносили в Pro-Mix PGX. Растения выращивали в течение 4-6 недель до сбора.

PMP выделяли из жидкости, полученной в результате промывки апопласта 4-6-недельных розеток растения рода Arabidopsis, как описано в Rutter и Innes, Plant Physiol. 173 (1): 728-741, 2017. Вкратце, полные розетки срезали у корня и подвергали вакуумной инфильтрации с буфером для выделения везикул (20 мМ MES, 2 мМ CaCl2 и 0,1 М NaCl, pH 6). Инфильтрованные растения осторожно промакивали для удаления излишков жидкости, помещали внутрь 30-мл шприца и центрифугировали в конических 50-мл пробирках при 700g в течение 20 мин при 2°C для сбора внеклеточной жидкости апопласта, содержащей EV. Затем внеклеточную жидкость апопласта фильтровали через фильтр с размером пор 0,85 мкм для удаления крупных частиц и PMP очищали, как описано в примере 2.

b) Выделение PMP из апопласта семян подсолнечника

Интактные семена подсолнечника (H. annuus L.) замачивали в воде на 2 часа,

очищали с удалением околоплодника и внеклеточную жидкость апопласта экстрагировали с помощью модифицированной процедуры вакуумной инфильтрации-центрифугирования, основанной на Regente et al, FEBS Letters. 583: 3363-3366, 2009. Вкратце, семена погружали в буфер для выделения везикул (20 мМ MES, 2 мМ CaCl2 и 0,1 М NaCl, pH 6) и подвергали действию трех вакуумных импульсов продолжительностью 10 с, разделенных интервалами 30 с, при давлении 45 кПа. Инфильтрованные семена извлекали, сушили на фильтровальной бумаге, помещали на пористые стеклянные фильтры и центрифугировали в течение 20 мин при 400 g при 4°C. Внеклеточную жидкость апопласта извлекали, фильтровали через фильтр с размером пор 0,85 мкм для удаления крупных частиц и PMP очищали, как описано в примере 2.

c) Выделение PMP из корней имбиря

Свежие корневищные корни имбиря (Zingiber officinale) приобретали у местного поставщика и промывали 3х раза с помощью PBS. В общей сложности 200 граммов промытых корней измельчали в миксере (12-скоростной измельчитель Osterizer) на самой высокой скорости в течение 10 мин (с паузой 1 мин после каждой 1 мин измельчения) и PMP выделяли, как описано в Zhuang et al., J Extracellular Vesicles. 4(1):28713, 2015. Вкратце, имбирный сок последовательно центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин, при 3000 g в течение 20 мин и при 10000 g в течение 40 мин для удаления крупных частиц из супернатанта, содержащего PMP. PMP очищали, как описано в примере 2.

d) Выделение PMP из грейпфрутового сока

Свежие грейпфруты (*Citrus* × *paradisi*) приобретали у местного поставщика, их кожуру удаляли и плоды выжимали вручную или измельчали в миксере (12-скоростной измельчитель Osterizer) на самой высокой скорости в течение 10 мин (с паузой 1 мин после каждой минуты измельчения) для сбора сока, как описано в Wang et al., Molecular Therapy. 22(3): 522-534, 2014, с незначительными модификациями. Вкратце, сок/мякоть сока последовательно центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин, при 3000 g в течение 20 мин и при 10000 g в течение 40 мин для удаления крупных частиц из супернатанта, содержащего PMP. PMP очищали, как описано в примере 2.

e) Выделение PMP из головок брокколи

PMP из брокколи (Brassica oleracea var. italica) выделяли, как описано ранее (Deng et al., Molecular Therapy, 25(7): 1641-1654, 2017). Вкратце, свежую брокколи приобретали у местного поставщика, трижды промывали с помощью PBS и измельчали в миксере (12-скоростной измельчитель Osterizer) на самой высокой скорости в течение 10 мин (с паузой 1 мин после каждой минуты измельчения). Затем сок брокколи последовательно центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин, при 3000 g в течение 20 мин и при 10000 g в течение 40 мин для удаления крупных частиц из супернатанта, содержащего PMP. PMP очищали, как описано в примере 2.

f) Выделение PMP из пыльцы оливкового дерева

EV из пыльцы оливкового дерева (Olea europaea) выделяли, как описано ранее в Prado et al., Molecular Plant. 7(3):573-577, 2014. Вкратце, пыльцу оливкового дерева (0,1 г)

гидратировали во влажной камере при комнатной температуре в течение 30 мин перед переносом в чашки Петри (диаметром 15 см), содержащие 20 мл среды для проращивания: 10% сахарозы, 0,03% $Ca(NO_3)_2$, 0,01% KNO_3, 0,02% $MgSO_4$ и 0,03% H_3BO_3. Пыльцу проращивали при 30°C в темноте в течение 16 ч. Пыльцевые зерна считались проросшими только в том случае, когда длина трубки превышала диаметр пыльцевого зерна. Культуральную среду, содержащую PMP, собирали и очищали от остатков пыльцы путем двух последовательных фильтраций на фильтрах с размером пор 0,85 мкм путем центрифугирования. PMP очищали, как описано в примере 2.

g) Выделение PMP из флоэмного сока растения рода Arabidopsis

Семена растения рода Arabidopsis (Arabidopsis thaliana Col-0) подвергали поверхностной стерилизации с помощью 50% отбеливателя и высевали на среду 0,53 Мурасиге-Скуга, содержащую 0,8% агара. Семена подвергали яровизации в течение 2 дней при 4°C перед перемещением в условия короткого дня (9-часовые дни, 22°C, 150 мкЭм$^{-2}$). Через 1 неделю проростки переносили в Pro-Mix PGX. Растения выращивали в течение 4-6 недель до сбора.

Флоэмный сок из 4-6-недельных листьев розеток растения рода Arabidopsis собирали, как описано в Tetyuk et al., JoVE 80, 2013. Вкратце, листья срезали у основания черешка, складывали стопкой и помещали в реакционную пробирку, содержащую 20 мМ K2-EDTA, на один час в темноте, чтобы предотвратить закупорку раны. Листья осторожно извлекали из емкости, тщательно промывали дистиллированной водой для удаления всей EDTA, помещали в чистую пробирку и флоэмный сок собирали в течение 5-8 часов в темноте. Листья удаляли, флоэмный сок фильтровали через фильтр с размером пор 0,85 мкм для удаления крупных частиц и PMP очищали, как описано в примере 2.

h) Выделение PMP из ксилемного сока растений томата

Семена томата (Solanum lycopersicum) высаживали в один горшок в богатую органическими веществами почву, такую как Sunshine Mix (Sun Gro Horticulture, Агавам, Массачусетс), и выдерживали в теплице при 22°C - 28°C. Приблизительно через две недели после прорастания, на стадии двух настоящих листьев, проростки по отдельности пересаживали в горшки (диаметром 10 см и глубиной 17 см), заполненные стерильной песчаной почвой, содержащей 90% песка и 10% смеси органических веществ. Растения выдерживали в теплице при 22-28°C в течение четырех недель.

Ксилемный сок из 4-недельных растений томата собирали, как описано Kohlen et al., Plant Physiology. 155(2):974-987, 2011. Вкратце, у растений томата обрезали верхушку над гипокотилем и вокруг стебля помещали пластиковое кольцо. Накапливающийся ксилемный сок собирали в течение 90 мин после обрезания верхушки. Ксилемный сок фильтровали через фильтр с размером пор 0,85 мкм для удаления крупных частиц и PMP очищали, как описано в примере 2.

i) Выделение PMP из среды для культивирования клеток табака BY-2

Клетки табака BY-2 (Nicotiana tabacum L cv. Bright Yellow 2) культивировали в темноте при 26°C на шейкере при 180 об/мин в MS-среде (Murashige and Skoog, 1962) для

культивирования BY-2 (pH 5,8), содержащей соли MS (Duchefa, Харлем, Нидерланды, № M0221) с добавлением 30 г/л сахарозы, 2,0 мг/л дигидрофосфата калия, 0,1 г/л миоинозита, 0,2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 1 мг/л тиамина HCl. Клетки BY-2 еженедельно пересевали путем переноса 5% (об/об) 7-дневной культуры клеток в 100 мл свежей жидкой среды. Через 72-96 часов культуральную среду BY-2 собирали и центрифугировали при 300 g при 4°C в течение 10 минут для удаления клеток. Супернатант, содержащий PMP, собирали и очищали от остатков путем фильтрации через фильтр с размером пор 0,85 мкм. PMP очищали, как описано в примере 2.

Пример 2. Получение очищенных пакетов-мессенджеров растений (PMP)

В этом примере описано получение очищенных PMP из фракций неочищенных PMP, описанных в примере 1, с применением ультрафильтрации в комбинации с эксклюзионной хроматографией, градиента плотности (йодиксанола или сахарозы) и удаления агрегатов посредством осаждения или эксклюзионной хроматографии.

Схема эксперимента

a) Получение очищенных PMP из грейпфрута с применением ультрафильтрации в комбинации с эксклюзионной хроматографией

Фракцию неочищенных PMP из грейпфрута из примера 1a концентрировали с применением спин-фильтра Amicon с отсечением по молекулярной массе (MWCO) 100 кДа (Merck Millipore). Затем концентрированный раствор неочищенных PMP загружали в колонку для эксклюзионной хроматографии PURE-EV (HansaBioMed Life Sciences Ltd) и выделение осуществляли в соответствии с инструкциями производителя. Очищенные фракции, содержащие PMP, объединяли после элюирования. Необязательно PMP могли дополнительно концентрировать с применением спин фильтра Amicon с MWCO 100 кДа или посредством фильтрации в тангенциальном потоке (TFF). Очищенные PMP анализировали, как описано в примере 3.

b) Получение очищенных PMP из апопласта растения рода Arabidopsis с применением градиента йодиксанола

Неочищенные PMP из апопласта листьев растения рода Arabidopsis выделяли, как описано в примере 1a, а очищенные PMP получали с применением градиента йодиксанола, как описано в Rutter and Innes, Plant Physiol. 173(1): 728-741, 2017. Для приготовления ступенчатых градиентов йодиксанола (OptiPrep; Sigma-Aldrich) получали растворы 40% (об/об), 20% (об/об), 10% (об/об) и 5% (об/об) йодиксанола путем разбавления исходного 60% водного раствора OptiPrep в буфере для выделения везикул (VIB; 20 мМ MES, 2 мМ CaCl2 и 0,1 М NaCl, pH 6). Градиент формировался путем наслоения 3 мл 40% раствора, 3 мл 20% раствора, 3 мл 10% раствора и 2 мл 5% раствора. Раствор неочищенных PMP из апопласта из примера 1a центрифугировали при 40000 g в течение 60 мин при 4°C. Осадок ресуспендировали в 0,5 мл VIB и наслаивали поверх градиента. Центрифугирование проводили при 100000 g в течение 17 ч при 4°C. Первые 4,5 мл в верхней части градиента удаляли, а затем собирали 3 объема по 0,7 мл, которые содержали PMP из апопласта, доводили их до 3,5 мл с помощью VIB и центрифугировали

при 100000 g в течение 60 мин при 4°C. Осадки промывали с помощью 3,5 мл VIB и повторно осаждали с применением тех же условий центрифугирования. Осадки очищенных PMP объединяли для последующего анализа, описанного в примере 3.

c) Получение очищенных PMP из грейпфрута с применением градиента сахарозы

Неочищенные PMP из грейпфрутового сока выделяли, как описано в примере 1d, центрифугировали при 150000 g в течение 90 мин и осадок, содержащий PMP, ресуспендировали в 1 мл PBS, как описано (Mu et al., Molecular Nutrition & Food Research. 58(7):1561-1573, 2014). Ресуспендированный осадок переносили в ступенчатый градиент сахарозы (8%/15%/30%/45%/60%) и центрифугировали при 150000 g в течение 120 мин с получением очищенных PMP. Очищенные PMP из грейпфрута собирали с границы раздела 30%/45% и затем анализировали, как описано в примере 3.

d) Удаление агрегатов из PMP из грейпфрута

Чтобы удалить белковые агрегаты из полученных PMP из грейпфрута, описанных в примере 1d, или из очищенных PMP из примера 2a-c, могли включать дополнительную стадию очистки. Полученный раствор PMP проводили через диапазон pH для осаждения агрегатов белка в растворе. pH доводили до 3, 5, 7, 9 или 11 путем добавления гидроксида натрия или хлористоводородной кислоты. pH измеряли с применением калиброванного pH-зонда. Как только раствор достигал заданного значения pH, его отфильтровывали для удаления твердых частиц. В качестве альтернативы раствор выделенных PMP можно подвергать флокуляции с применением добавления заряженных полимеров, таких как Polymin-P или Praestol 2640. Вкратце, Polymin-P или Praestol 2640 добавляли из расчета 2-5 г на л раствора и перемешивали лопастной мешалкой. Затем раствор отфильтровывали для удаления твердых частиц. В качестве альтернативы агрегаты подвергали солюбилизации путем повышения концентрации соли. NaCl добавляли к раствору PMP до достижения концентрации 1 моль/л. Затем раствор фильтровали с очисткой PMP. В качестве альтернативы агрегаты солюбилизировали путем повышения температуры. Смесь выделенных PMP нагревали при перемешивании до тех пор, пока раствор не достигал однородной температуры 50°C, в течение 5 минут. Затем смесь PMP отфильтровывали с выделением PMP. В качестве альтернативы растворимые контаминанты отделяли из растворов PMP с помощью колонки для эксклюзионной хроматографии в соответствии со стандартными процедурами, где PMP элюировались в первых фракциях, в то время как белки и рибонуклеопротеины, а также некоторые липопротеины элюировались позже. Эффективность удаления агрегатов белка определяли путем измерения и сравнения концентрации белка до и после удаления агрегатов белка с помощью количественного определения белка с помощью BCA/метода Бредфорда. Полученные PMP анализировали так, как описано в примере 3.

Пример 3. Определение характеристик пакетов-мессенджеров растений

В этом примере описано определение характеристик PMP, полученных, как описано в примере 1 или примере 2.

Схема эксперимента

a) Определение концентрации PMP

Концентрацию частиц PMP определяли с помощью анализа отслеживания наночастиц (NTA) с применением Malvern NanoSight или с помощью настраиваемого резистивного импульсного датчика (TRPS) с применением iZon qNano в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию белка в очищенных PMP определяли с помощью анализа белка DC (Bio-Rad). Концентрацию липидов в очищенных PMP определяли с применением флуоресцентного липофильного красителя, такого как DiOC6 (ICN Biomedicals), как описано в Rutter and Innes, Plant Physiol. 173(1): 728-741, 2017. Вкратце, очищенные гранулы PMP из примера 2 ресуспендировали в 100 мл 10 мМ DiOC6 (ICN Biomedicals), разбавленного буфером MES (20 мМ MES, pH 6) с 1% коктейлем ингибиторов протеаз растений (Sigma-Aldrich) и 2 мМ 2,29-дипиридилдисульфида. Ресуспендированные PMP инкубировали при 37°C в течение 10 мин, промывали с помощью 3 мл буфера MES, повторно осаждали (40000 g, 60 мин при 4°C) и ресуспендировали в свежем буфере MES. Интенсивность флуоресценции DiOC6 измеряли при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны излучения 535 нм.

b) Определение биофизических и молекулярных характеристик PMP

Характеристики PMP определяли с помощью электронной и криоэлектронной микроскопии на трансмиссионном электронном микроскопе JEOL 1010 в соответствии с протоколом из Wu et al., Analyst. 140(2):386-406, 2015. Размер и дзета-потенциал PMP также измеряли с помощью Zetasizer от Malvern или qNano от iZon согласно инструкциям производителя. Липиды выделяли из PMP с применением экстракции хлороформом и характеризовали с помощью LC-MS/MS, как показано в Xiao et al. Plant Cell. 22(10): 3193-3205, 2010. Липиды, представляющие собой гликозилинозитолфосфорилцерамиды (GIPC), экстрагировали и очищали, как описано в Cacas et al., Plant Physiology. 170: 367-384, 2016, и анализировали с помощью LC-MS/MS, как описано выше. Общую РНК, ДНК и белок характеризовали с применением наборов Quant-It от Thermo Fisher в соответствии с инструкциями. Белки PMP характеризовали с помощью LC-MS/MS в соответствии с протоколом в Rutter and Innes, Plant Physiol. 173(1): 728-741, 2017. РНК и ДНК экстрагировали с использованием Trizol, готовили в виде библиотек с помощью TruSeq Total RNA с набором Ribo-Zero Plant и набором Nextera Mate Pair Library Prep Kit от Illumina и секвенировали на MiSeq от Illumina в соответствии с инструкциями производителя.

Пример 4. Определение характеристик стабильности пакетов-мессенджеров растений

В этом примере описано измерение стабильности PMP в широком диапазоне условий хранения и физиологических условий.

Схема эксперимента

PMP, полученные, как описано в примерах 1 и 2, подвергали воздействию различных условий. PMP суспендировали в воде, 5% сахарозе или PBS и оставляли на 1, 7, 30 и 180 дней при -20°C, 4°C, 20°C и 37°C. PMP также суспендировали в воде и сушили

с помощью роторной испарительной системы и оставляли на 1, 7, а также 30 и 180 дней при 4°C, 20°C и 37°C. PMP также суспендировали в воде или 5% растворе сахарозы, подвергали мгновенной заморозке в жидком азоте и лиофилизации. Через 1, 7, 30 и 180 дней высушенные и лиофилизированные PMP ресуспендировали в воде. Предыдущие три эксперимента с условиями при температурах выше 0°C также проводили при воздействии искусственного имитатора солнечного света, чтобы определить стабильность состава в условиях, моделирующих УФ-излучение вне помещения. PMP также подвергали воздействию температур 37°C, 40°C, 45°C, 50°C и 55°C в течение 1, 6 и 24 часов в буферных растворах с pH 1, 3, 5, 7 и 9 с добавлением или без добавления 1 единицы трипсина или других имитаций желудочного сока.

После каждой из этих обработок PMP возвращали к температуре 20°C, нейтрализовали до pH 7,4 и определяли их характеристики с применением некоторых или всех способов, описанных в примере 3.

Пример 5. Загрузка PMP полезным грузом

В этом примере описаны способы загрузки PMP низкомолекулярными соединениями, белками и нуклеиновыми кислотами.

a) Загрузка низкомолекулярных соединений в PMP

PMP получали, как описано в примере 1 и примере 2. Чтобы загрузить в PMP низкомолекулярные соединения, PMP помещали в раствор PBS с низкомолекулярным соединением либо в твердой форме, либо в солюбилизированном виде. Раствор оставляли на 1 час при 22°C в соответствии с протоколом из Sun, Mol. Ther., 2010. В качестве альтернативы раствор обрабатывали ультразвуком, чтобы индуцировать образование пор и диффузию в экзосомы, в соответствии с протоколом из Wang et al, Nature Comm., 2013. В качестве альтернативы PMP подвергали электропорации в соответствии с протоколом из Wahlgren et al, Nucl. Acids. Res. 2012.

В качестве альтернативы липиды PMP выделяли путем добавления 3,75 мл 2:1 смеси (об./об.) MeOH:CHCl3 к 1 мл PMP в PBS и встряхивали на вортексе. Последовательно добавляли CHCl3 (1,25 мл) и ddH2O (1,25 мл) и встряхивали на вортексе. Затем смесь центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин при 22°C в стеклянных пробирках для разделения смеси на две фазы (водную фазу и органическую фазу). Образец органической фазы, содержащий липиды PMP, высушивали нагреванием в атмосфере азота (2 фунта на квадратный дюйм). Для получения PMP, загруженных низкомолекулярным соединением, выделенные липиды PMP смешивали с раствором низкомолекулярного соединения и пропускали через липидный экструдер в соответствии с протоколом из Haney et al, J Contr. Rel., 2015.

Перед применением загруженные PMP очищали с применением способов, описанных в примере 2, для удаления несвязанных низкомолекулярных соединений. Характеристики загруженных PMP определяли, как описано в примере 3, и их стабильность тестировали, как описано в примере 4.

b) Загрузка белков или пептидов в PMP

PMP получали, как описано в примере 1 и примере 2. Чтобы загрузить в PMP белки или пептиды, PMP помещали в раствор с белком или пептидом в PBS. Если белок или пептид были нерастворимы, pH корректировали, пока они не становились растворимыми. Если белок или пептид были все еще нерастворимыми, использовали нерастворимый белок или пептид. Затем раствор обрабатывали ультразвуком, чтобы индуцировать образование пор и диффузию в PMP, в соответствии с протоколом из Wang et al, Nature Comm., 2013. В качестве альтернативы PMP подвергали электропорации в соответствии с протоколом из Wahlgren et al, Nucl. Acids. Res. 2012.

В качестве альтернативы липиды PMP выделяли путем добавления 3,75 мл 2:1 смеси (об./об.) MeOH:CHCl3 к 1 мл PMP в PBS и встряхивали на вортексе. Последовательно добавляли CHCl3 (1,25 мл) и ddH2O (1,25 мл) и встряхивали на вортексе. Затем смесь центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин при 22°C в стеклянных пробирках для разделения смеси на две фазы (водную фазу и органическую фазу). Образец органической фазы, содержащий липиды PMP, высушивали нагреванием в атмосфере азота (2 фунта на квадратный дюйм). Для получения PMP, загруженных низкомолекулярным соединением, выделенные липиды PMP смешивали с раствором низкомолекулярного соединения и пропускали через липидный экструдер в соответствии с протоколом из Haney et al, J Contr. Rel., 2015.

Перед применением загруженные PMP очищали с применением способов, описанных в примере 2, для удаления несвязанных пептидов и белка. Характеристики загруженных PMP определяли, как описано в примере 3, и их стабильность тестировали, как описано в примере 4. Чтобы измерить уровень загрузки белка или пептида, количественный колориметрический анализ пептидов по методу Пирса использовали на небольшом образце загруженных и незагруженных PMP.

c) Загрузка нуклеиновых кислот в PMP

PMP получали, как описано в примере 1 и примере 2. Чтобы загрузить в PMP нуклеиновые кислоты, PMP помещали в раствор с нуклеиновой кислотой в PBS. Затем раствор обрабатывали ультразвуком, чтобы индуцировать образование пор и диффузию в PMP, в соответствии с протоколом из Wang et al, Nature Comm., 2013. В качестве альтернативы PMP подвергали электропорации в соответствии с протоколом из Wahlgren et al, Nucl. Acids. Res. 2012.

В качестве альтернативы липиды PMP выделяли путем добавления 3,75 мл 2:1 смеси (об./об.) MeOH:CHCl3 к 1 мл PMP в PBS и встряхивали на вортексе. Последовательно добавляли CHCl3 (1,25 мл) и ddH2O (1,25 мл) и встряхивали на вортексе. Затем смесь центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин при 22°C в стеклянных пробирках для разделения смеси на две фазы (водную фазу и органическую фазу). Образец органической фазы, содержащий липиды PMP, высушивали нагреванием в атмосфере азота (2 фунта на квадратный дюйм). Для получения PMP, загруженных низкомолекулярным соединением, выделенные липиды PMP смешивали с раствором низкомолекулярного соединения и пропускали через липидный экструдер в соответствии

с протоколом из Haney et al, J Contr. Rel., 2015.

Перед применением PMP очищали с применением способов, описанных в примере 2, для удаления несвязанных нуклеиновых кислот. Характеристики загруженных PMP определяли, как описано в примере 3, и их стабильность тестировали, как описано в примере 4. Количественное определение нуклеиновых кислот, загруженных в PMP, проводили либо с использованием анализа Quant-It от Thermo Fisher в соответствии с инструкциями производителя, либо, если нуклеиновые кислоты метили флуоресцентной меткой, флуоресценцию определяли количественно с использованием планшет-ридера.

Пример 6. Модификация растения посредством PMP-опосредованной доставки плазмид in planta

В этом примере описана загрузка и функциональная доставка загруженных плазмидами PMP in planta для воздействия на приспособленность растения. В этом примере дополнительно продемонстрировано, что загруженные плазмидами PMP являются стабильными и сохраняют свою активность в различных условиях обработки и условиях окружающей среды.

В этом примере хлопчатник применяли в качестве модельного растения, PMP из грейпфрута в качестве модельного PMP, а репортерный вектор экспрессии pCambia1303 GUSA:mGFP5 использовали в качестве модельной плазмиды.

Схема обработки

Раствор PMP из грейпфрута составляли с эквивалентной дозой, содержащей 0 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл и 20 мкг/мл плазмид в стерильной воде.

Протокол эксперимента

Загрузка PMP из грейпфрута репортерной плазмидой GUSA:mGFP5

PMP получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Чтобы продемонстрировать функциональную доставку плазмиды с помощью PMP, PMP из грейпфрута загружали репортерной плазмидой pCambia1303 (12361 п. о.; приобретена у Marker Gene Technologies), которая экспрессирует слитые репортерные гены gusA:mgfp5 под управлением варианта промотора CaMV35S с двойным энхансером и оканчивается сигналом полиА из CaMV35S. При транскрипции оба гена GUSA и mGFP5 транскрибируются и могут быть обнаружены. Плазмиду pCambia1303 загружали в PMP посредством способов, описанных в примере 5.

Инкапсуляцию плазмиды в PMP определяли с использованием ПЦР-анализа. Общую геномную ДНК выделяли из загруженных PMP с применением стандартных процедур. Для ПЦР-анализа 50 нг общей ДНК добавляли к 10 мкл раствора, содержащего 5 мкл RedTaq Readymix (Sigma Aldrich) и по 0,1 микромоль каждой пары праймеров для амплификации гена mgfp5: 5′-AAG GAG AAG AAC TTT TCA CTG GAG-3′ (SEQ ID NO: 7) и 5′-AGT TCA TCC ATG CCA TGT GTA-3′ (SEQ ID NO: 8). ПЦР-амплификацию проводили в термоциклере с начальной денатурацией при 95°C в течение 1 мин, с последующими 30 циклами при 95°C в течение 1 мин, 55°C в течение 1 мин, 68°C в течение 1 мин и конечной элонгацией при 68°C в течение 10 мин. Продукты ПЦР

разделяли с применением электрофореза на 1,0% агарозном геле и получали изображения. Гель оценивали в отношении наличия и интенсивности окрашивания продукта mgfp5 (≈700 п. о.) в сравнении с известными количествами плазмиды pCambia1303. Загруженные плазмидой PMP составляли в воде при концентрации, которая доставляет эквивалент дозы плазмиды, составляющей 0 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл и 20 мкг/мл плазмиды в стерильной воде, и эквивалентную концентрацию незагруженных PMP использовали в качестве контроля. Стабильность загруженных плазмидами PMP измеряли, как описано в примере 4.

Функциональная доставка PMP из грейпфрута, загруженных репортерной плазмидой GUSA:mGFP5, в растения хлопчатника

Семена хлопчатника (Gossypium hirsutum и Gossypium raimondii) получали через Национальную систему зародышевой плазмы растений США (US National Plant Germplasm System). Стерилизованные семена заворачивали во влажную впитывающую вату, помещали в чашки Петри и помещали в ростовую камеру при 25°C, интенсивности света 150 мкЭ $м^{-2}$ $с^{-1}$, с фотопериодом 14 часов света/10 часов темноты на 3 дня для прорастания. Проростки выращивали в стерильных культуральных сосудах с питательным раствором Хогланда (Sigma Aldrich) в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16/8 ч) при температуре 26/20°C день/ночь. Через 4 дня проростки с полностью распустившимися семядолями (до появления первого истинного листа) использовали для обработки их PMP.

Семидневные проростки хлопчатника переносили в среду на основе 0,5 х дозы минеральных солей Мурасиге и Скуга (MS) (Sigma Aldrich) с 1 х дозой витаминов MS (Sigma Aldrich), pH 5,6-5,8, с 0,8% (вес./об.) агарозы и обрабатывали эффективной дозой, содержащей 0 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл и 20 мкг/мл плазмиды в стерильной воде (ddH2O), и эквивалентной концентрацией незагруженных PMP, применяемой в качестве контроля, путем опрыскивания проростков целиком из расчета 1 мл раствора на растение при 3 растениях на группу. В качестве альтернативы перед обработкой PMP нижнюю сторону семядолей растения хлопчатника перфорировали иглой калибром 25 G без полного прокалывания семядолей. Растворы PMP (в случае данного применения составленные в среде VIB (20 мМ MES, 2 мМ CaCl2, и 0,1 М NaCl, pH 6)) инфильтрировали вручную с нижней части семядолей через участки повреждений с использованием безыгольного 1-мл шприца. В качестве альтернативы 4-дневные проростки поддерживали в условиях гидропонной культуры и композиции на основе загруженных плазмидами PMP добавляли к ростовой среде, чтобы определить поглощение PMP корнями. Все растения переносили в ростовую камеру и выдерживали в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16 ч/8 ч) при интенсивности света 90 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$ и температуре 26/20°C день/ночь.

Через 1, 2, 3, 5, 8 и 14 дней определяли экспрессию генов GFP и GUS для оценки функциональной доставки загруженных плазмидами PMP в растительные клетки. Общий белок экстрагировали из 100 мг свежих листьев хлопчатника (способы) и добавляли

ингибиторы растительных протеаз. Вестерн-блоттинг для GFP (ab1218, Abcam) проводили с применением актина (ab197345, Abcam) в качестве контроля загрузки. Относительную экспрессию GFP нормализовали по актину и сравнивали между обработками с помощью загруженных плазмид PMP, составами и контролями. Кроме того, перед проведением выделения белка растения хлопчатника исследовали на экспрессию GFP с помощью флуоресцентной микроскопии (EVOS2 FL).

В растениях, обработанных загруженных плазмидами PMP, и контролях гистохимическую локализацию активности GUS анализировали после инкубирования растений в буфере X-gluc (буфер на основе 50 мМ фосфата натрия, pH 7,0, 10 мМ EDTA, 0,1% Triton X-100, 0,5 мМ ферроцианида калия и 2 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолилглюкуронида (X-gluc)) при 37°C в течение 12 ч. Светлопольные изображения получали с применением препаровального микроскопа.

PMP из грейпфрута, загруженные плазмидами pCambia1303, осуществляли функциональную доставку своего полезного груза в растительные клетки и приводили к успешной транскрипции репортерных белков, закодированных в плазмиде.

Пример 7. Модификация растения посредством PMP-опосредованной доставки коротких нуклеиновых кислот

В этом примере описана загрузка и функциональная доставка загруженных короткими нуклеиновыми кислотами PMP in planta для воздействия на приспособленность растения. В этом примере дополнительно продемонстрировано, что загруженные короткими нуклеиновыми кислотами PMP являются стабильными и сохраняют свою активность в различных условиях обработки и условиях окружающей среды. В этом примере хлопчатник применяли в качестве модельного растения, PMP из грейпфрута в качестве модельного PMP, а amiRNA, нацеливающуюся на Cla1, применяли в качестве модельной dsRNA.

Схема обработки

Раствор PMP из грейпфрута составляли с эффективной дозой, содержащей 0 нг/мкл (отрицательный контроль), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл dsRNA в стерильной воде.

Протокол эксперимента

Загрузка PMP из грейпфрута с помощью dsRNA CLA1

Чтобы продемонстрировать клеточное поглощение PMP in planta, PMP из грейпфрута загружали искусственными miRNA (amiRNA, разработанными с использованием P-SAMS (p-sama.carringtonlab.org)) или изготовленной на заказ siRNA, служащей субстратом для dicer (DsiRNA, разработанная IDT), нацеливающейся на ген фотосинтеза GrCLA1 (1-дезокси-D-ксилулозо-5-фосфатсинтаза) у хлопчатника. GrCLA1 является геном-гомологом гена Cloroplastos alterados 1 (AtCLA1) у растения рода Arabidopsis, потеря функции которого приводит к альбиносному фенотипу на истинных листьях, обеспечивая визуальный маркер эффективности сайленсинга. Олигонуклеотиды получали из IDT.

PMP получали из грейпфрута так, как это описано в примере 1 и примере 2. Чтобы

определить поглощение PMP, PMP из грейпфрута загружали дуплексами GrCLA1-amiRNA или GrCLA1-DsiRNA (таблица 1), как описано в примере 5. Инкапсулирование amiRNA или DsiRNA в PMP измеряли с использованием набора для анализа РНК Quant-It RiboGreen или с использованием контрольных amiRNA или DsiRNA, меченных флуоресцентным красителем (IDT). Чтобы определить эффект PMP у PMP, загруженных CLA1-amiRNA/DsiRNA, в сравнении с незагруженными PMP, проростки хлопчатника обрабатывали и анализировали в отношении сайленсинга гена CLA1. PMP, загруженные amiRNA или DsiRNA (в совокупности называемыми dsRNA), составляли в воде до концентрации, которая обеспечивает доставку эквивалента эффективной дозы dsRNA, составляющей 0, 1, 5, 10 и 20 нг/мкл в стерильной воде, и эквивалентную концентрацию незагруженных PMP доставляли в качестве контроля. Стабильность PMP, загруженных dsRNA, измеряли, как описано в примере 4.

Функциональная доставка PMP из грейпфрута, загруженных dsRNA, нацеливающейся на CLA1, в растениях хлопчатника

Семена хлопчатника (Gossypium hirsutum и Gossypium raimondii) получали через Национальную систему зародышевой плазмы растений США (US National Plant Germplasm System). Стерилизованные семена заворачивали во влажную впитывающую вату, помещали в чашки Петри и помещали в ростовую камеру при 25°C, интенсивности света 150 мкЭ $м^{-2}$ $с^{-1}$, с фотопериодом 14 часов света/10 часов темноты на 3 дня для прорастания. Проростки выращивали в стерильных культуральных сосудах с питательным раствором Хогланда (Sigma Aldrich) в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16/8 ч) при температуре 26/20°C день/ночь. Через 4 дня проростки с полностью распустившимися семядолями (до появления первого истинного листа) использовали для обработки их PMP.

Семидневные проростки хлопчатника переносили в среду на основе 0,5 х дозы минеральных солей Мурасиге и Скуга (MS) (Sigma Aldrich) с 1 х дозой витаминов MS (Sigma Aldrich), pH 5,6-5,8, с 0,8% (вес./об.) агарозы и обрабатывали эффективной дозой, содержащей 0 (ddH2O), 1, 5, 10 и 20 нг/мкл PMP, загруженных GrCLA1-dsRNA, и эквивалентной концентрацией частиц PMP, представляющих собой немодифицированные PMP из грейпфрута, путем опрыскивания проростков целиком из расчета 1 мл раствора на растение при 3 растениях на группу. В качестве альтернативы перед обработкой PMP нижнюю сторону семядолей растения хлопчатника перфорировали иглой калибром 25 G без полного прокалывания семядолей. Растворы PMP инфильтрировали вручную с нижней части семядолей через участки повреждений с использованием безыгольный 1-мл шприц. Растения переносили в ростовую камеру и выдерживали в условиях длинного дня (фотопериод свет/темнота 16 ч/8 ч) при интенсивности света 90 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$ и температуре 26/20°C день/ночь.

Через 2, 5, 8 и 14 дней эффективность сайленсинга гена CLA1 под действием dsRNA оценивали по уровню экспрессии эндогенной мРНК CLA1 с использованием количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (qRT-PCR).

Общую РНК экстрагировали из 100 мг свежих листьев хлопчатника с использованием реагента Trizol в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen) и обрабатывали большим количеством ДНКазы I, не содержащей РНКаз (Promega). Первую нить кДНК синтезировали из 2 мкг общей РНК с помощью системы для синтеза первой нити SuperScript™ (Invitrogen). Для оценки уровней транскриптов CLA1 проводили qRT-PCR с использованием мастер-микса для ПЦР в режиме реального времени SYBR Green (Thermo Scientific) с праймерами: GrCLA1q1_F 5'-CCAGGTGGGGCTTATGCATC-3' (SEQ ID NO: 9), GrCLA1q1_R 5'-CCACACCAAGGCTTGAACCC-3' (SEQ ID NO: 10), и GrCLA1q2_F 5'-GGCCGGATTCACGAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 11), GrCLA1q2_R 5'-CGTCGAGATTGGCAGTTGGC-3' (SEQ ID NO: 12), и 18s RNA_F 5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3' (SEQ ID NO: 13), 18s RNA_ R 5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3' (SEQ ID NO: 7), с применением следующей программы: (a) 95°C в течение 5 мин; (b) 40 циклов: 94°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с и 72°C в течение 30 с. Ген 18S rRNA использовали в качестве внутреннего контроля для нормализации результатов. Эффективность нокдауна CLA1 у хлопчатника после обработки PMP, загруженными CLA1-dsRNA, по сравнению с немодифицированными PMP и водой в качестве контроля определяли путем расчета значения ΔΔCt, сравнивая нормализованную экспрессию CLA1 после обработки PMP, загруженными dsRNA, с нормализованной экспрессией CLA1 после обработки немодифицированными PMP.

Кроме того, эффективность сайленсинга гена CLA1 под действием dsRNA оценивали с помощью фенотипического анализа фотообесцвечивания. Листья обработанных и необработанных растений хлопчатника фотографировали и программное обеспечение ImageJ использовали для определения процентного значения сайленсинга гена, о чем свидетельствует белое фотообесцвечивание листа по сравнению с зеленым цветом контрольных листьев. Для количественной оценки эффекта фотообесцвечивания исследовали по три листа на растение и эффективность сайленсинга гена оценивали у PMP, загруженных CLA1-dsRNA, в сравнении с контролем.

PMP, загруженные CLA1-dsRNA, обеспечивали функциональную доставку in planta и индуцировали сайленсинг гена CLA1 и фенотип фотообесцвечивания по сравнению с немодифицированными PMP и водой в качестве контроля.

Таблица 1. GrCLA1-amiRNA и GrCLA1-DsiRNA

Вид	**Название гена**	**Референтная последовательность**	**Тип**	**Название**	**dsRNA (5'-3')**	**dsRNA* (5'-3')**
Gossypium	GhCLA1	CotAD_74769_BGI-	amiRNA	amiRNA_G	UGGCAACAAUAUUUUUGUCUC	GACAAAAAGAUUGUUGCCACA

hirsutum		AD1_v1.0		hCL-1	(SEQ ID NO: 15)	(SEQ ID NO: 16)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	CotAD_74769_BGI-AD1_v1.0	amiRNA	amiRNA_GhCL-2	UUAGUACCCUGCCUUUGCCAU (SEQ ID NO: 17)	GGCAAAGGAAGGGUACUAACA (SEQ ID NO: 18)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	CotAD_74769_BGI-AD1_v1.0	amiRNA	amiRNA_GhCL-3	UACUUCGUGUGACUUUGCCAC (SEQ ID NO: 19)	GGCAAAGUAACACGAAGUACA (SEQ ID NO: 20)
Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_012600276	amiRNA	amiRNA_GrCL-1	UGGCAACAAUAUUUUUGUCUC (SEQ ID NO: 21)	GACAAAAAGAUUGUUGCCACA (SEQ ID NO: 22)
Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_012600276	amiRNA	amiRNA_GrCL-2	UCAGUACCCUGCCUUUGCCAU (SEQ ID NO: 23)	GGCAAAGGAAGGGUACUGACA (SEQ ID NO: 24)
Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_012600276	amiRNA	amiRNA_GrCL-3	UACUUCGUGUGACUUUGCCAC (SEQ ID NO: 25)	GGCAAAGUAACACGAAGUACA (SEQ ID NO: 26)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV01059036	amiRNA	amiRNA_GhCL-4	UUAGUGGCCAUCAACAGGCCG (SEQ ID NO: 27)	GCCUGUUGCUGGCCACUAACA (SEQ ID NO: 28)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV01059036	amiRNA	amiRNA_GhCL-5	UAUCGAUGUUAGUGGCCACCU (SEQ ID NO:29)	GUGGCCACGAACAUCGAUACA (SEQ ID NO: 30)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV01059036	amiRNA	amiRNA_GhCL-6	UACCGGUACCCGUUGUUUCAC (SEQ ID NO: 31)	GAAACAACUGGUACCGGUACA (SEQ ID NO: 32)
Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_012600276	DsiRNA	DsiRNA_GrCL-1	CAGUCCACUUAGUAUCAUCAUCAAG (SEQ ID NO: 33)	CUUGAUGAUGAUACUAAGUGGACUGUG (SEQ ID NO: 34)
Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_012600276	DsiRNA	DsiRNA_GrCL-2	GUCCACUUAGUAUCAUCAUCAAGCA (SEQ ID NO: 35)	UGCUUGAUGAUGAUACUAAGUGGACUG (SEQ ID NO: 36)

Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_012600276	DsiRNA	DsiRNA_GrCL-3	AGUCCACUUAGUAUCAUCAUCAAGC (SEQ ID NO: 37)	GCUUGAUGAUGAUACUAAGUGGACUGU (SEQ ID NO: 38)
Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_012600276	DsiRNA	DsiRNA_GrCL-4	AAUCUUUCAUUGAUUGGAUAGCCTT (SEQ ID NO: 39)	AAGGCUAUCCAAUCAAUGAAAGAUUUA (SEQ ID NO: 40)
Gossypium raimondii	GrCLA1	XM_012600276	DsiRNA	DsiRNA_GrCL-5	CAACAACCUUACGAGUAAUAUCACA (SEQ ID NO: 41)	UGUGAUAUUACUCGUAAGGUUGUUGGG (SEQ ID NO: 42)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV01059036	DsiRNA	DsiRNA_GhCL-1	CAUCGAUGAUUUAGUUUCUAUUCTC (SEQ ID NO: 43)	GAGAAUAGAAACUAAAUCAUCGAUGUU (SEQ ID NO: 44)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV01059036	DsiRNA	DsiRNA_GhCL-2	UCGAUGAUUUAGUUUCUAUUCUCAA (SEQ ID NO: 45)	UUGAGAAUAGAAACUAAAUCAUCGAUG (SEQ ID NO: 46)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV01059036	DsiRNA	DsiRNA_GhCL-3	AUCGAUGAUUUAGUUUCUAUUCUCA (SEQ ID NO: 47)	UGAGAAUAGAAACUAAAUCAUCGAUGU (SEQ ID NO: 48)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV01059036	DsiRNA	DsiRNA_GhCL-4	CGAUGAUUUAGUUUCUAUUCUCAAA (SEQ ID NO: 49)	UUUGAGAAUAGAAACUAAAUCAUCGAU (SEQ ID NO: 50)
Gossypium hirsutum	GhCLA1	GALV01059036	DsiRNA	DsiRNA_GhCL-5	GAUAUGAUUGUUAUUCUUAAUGACA (SEQ ID NO: 51)	UGUCAUUAAGAAUAACAAUCAUAUCAG (SEQ ID NO: 52)

Пример 8. Модификация растения посредством PMP-опосредованной доставки плазмид в протопласты

В этом примере описана загрузка и функциональная доставка загруженных плазмидами PMP в протопласты для воздействия на приспособленность растения. В этом примере дополнительно продемонстрировано, что загруженные плазмидами PMP являются стабильными и сохраняют свою активность в различных условиях обработки и условиях окружающей среды.

В этом примере, протопласты сои применяли в качестве модельных протопластов, PMP из BY-2 в качестве модельного PMP, а репортерный вектор экспрессии pCambia1303 GUSA:mGFP5 применяли в качестве модельной плазмиды.

Схема обработки

Раствор PMP из BY-2 составлен с эквивалентной дозой в 0 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл и 20 мкг/мл плазмиды в стерильной воде.

Протокол эксперимента

Загрузка PMP из BY-2 репортерной плазмидой GUSA:mGFP5.

PMP получали в линии клеток BY-2 так, как это описано в примере 1 и примере 2. Чтобы продемонстрировать функциональную доставку плазмиды с помощью PMP, PMP из BY-2 загружали репортерной плазмидой pCambia1303 (12361 п. о.; приобретена у Marker Gene Technologies), которая экспрессирует слитые репортерные гены gusA:mgfp5 под управлением варианта промотора CaMV35S с двойным энхансером и оканчивается сигналом полиА из CaMV35S. При транскрипции оба гена GUSA и mGFP5 транскрибируются и могут быть обнаружены. Плазмиду pCambia1303 загружали в PMP посредством способов, описанных в примере 5.

Инкапсуляцию плазмиды в PMP определяли с использованием ПЦР-анализа. Общую геномную ДНК выделяли из загруженных PMP с применением стандартных процедур. Для ПЦР-анализа 50 нг общей ДНК добавляли к 10 мкл раствора, содержащего 5 мкл RedTaq Readymix (Sigma Aldrich) и по 0,1 микромоль каждой пары праймеров для амплификации гена mgfp5: 5′-AAG GAG AAG AAC TTT TCA CTG GAG-3′ (SEQ ID NO: 7) и 5′-AGT TCA TCC ATG CCA TGT GTA-3′ (SEQ ID NO: 8). ПЦР-амплификацию проводили в термоциклере с начальной денатурацией при 95°C в течение 1 мин, с последующими 30 циклами при 95°C в течение 1 мин, 55°C в течение 1 мин, 68°C в течение 1 мин и конечной элонгацией при 68°C в течение 10 мин. Продукты ПЦР разделяли с применением электрофореза на 1,0% агарозном геле и получали изображения. Гель оценивали в отношении наличия и интенсивности окрашивания продукта mgfp5 (≈700 п. о.) в сравнении с известными количествами плазмиды pCambia1303. Загруженные плазмидой PMP составляли в воде при концентрации, которая доставляет эквивалент дозы плазмиды, составляющей 0 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл и 20 мкг/мл плазмиды в стерильной воде, и эквивалентную концентрацию незагруженных PMP использовали в качестве контроля. Стабильность загруженных плазмидами PMP измеряли, как описано в примере 4.

Выделение протопластов сои

Семена сои (Glycine max (L.) Merr.) получали через Национальную систему зародышевой плазмы растений США (US National Plant Germplasm System). 5-10 семян сои (Williams 82) высевали в 13 см горшок в ростовой камере в условиях длинного дня (16 ч света при 1500 мкмоль $м^{-2}$ $с^{-1}$) при 25°C на изготовленной специально для сои почвенной смеси (почва, перлит и крупнозернистый песок в соотношении 1:1:1). Протопласты выделяли, как описано в Wu и Hanzawa, 2018 J. Vis.Exp. (131), e57258. Вкратце, только что развернувшиеся простые листы срезали с 10-дневных проростков сои. Центральную жилку простого листа удаляли с помощью нового лезвия бритвы, а остальную часть листа нарезали полосками 0,5-1 мм. С применением пинцета листовые полоски немедленно и бережно переносили в 10 мл свежеприготовленного раствора ферментов (20 мМ MES, pH 5,7, 2% (вес./об.) целлюлазы CELF, 0,1% (вес./об.) пектолиазы Y-23, 0,75 М маннита, 0,2 мМ CaCl2, 0,1% (вес./об.) BSA, 0,5 мМ DTT) в 15-мл пробирке. Листовые полоски подвергали вакуумной инфильтрации в течение 15 мин при комнатной температуре и инкубировали листовые полоски в растворе ферментов при легком перемешивании (40 об/мин) в условиях слабого освещения в течение 4-6 ч при комнатной температуре. 10 мл раствора, содержащего ферменты/протопласты, переносили посредством осторожного переливания в 50-мл пробирку и для остановки расщепления добавляли 10 мл раствора W5 (2 мМ MES, pH 5,7, 154 мМ NaCl, 125 мМ CaCl2, 5 мМ KCl) при комнатной температуре. Для удаления нерасщепленных растительных тканей раствор, содержащий ферменты/протопласты, выливали на чистое нейлоновое сито с размером пор 75 мкм, помещенное на верхушке 50-мл пробирки. Фильтрат раствора, содержащего ферменты/протопласты, центрифугировали при 100 x g в 50-мл пробирке в течение 1-2 мин при комнатной температуре и супернатант удаляли, не взбалтывая осадок из протопластов. Ресуспендированные протопласты разбавляли раствором W5, охлажденным до 4°C, до концентрации 2×10^5 клеток/мл при подсчете количества протопластов в гемоцитометре. После промывания протопласты ресуспендировали в растворе MMG (4 мМ MES, pH 5,7, 400 мМ маннита, 15 мМ MgCl2) при концентрации 2×10^5 клеток/мл при комнатной температуре.

Функциональная доставка PMP из BY-2, загруженных репортерной плазмидой GUSA:mGFP5, в протопласты сои

100 мкл раствора протопластов, содержащего 2×10^4 протопластов при концентрации 2×10^5 клеток/мл, переносили в 24-луночный планшет с плоским дном. Протопласты обрабатывали эффективной дозой, содержащей 0, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл и 20 мкг/мл плазмид в стерильной воде (ddH2O), и эквивалентную концентрацию незагруженных PMP использовали в качестве контроля. Если было необходимо добавить более 100 мкл раствора PMP, PMP составляли в растворе MMG и добавляли в трех повторностях в каждый момент времени.

Через 2 часа, 4 часа, 6 часов, 1 день, 2 дня и 3 дня определяли экспрессию GFP и GUS для оценки функциональной доставки загруженных плазмидами PMP в протопласты

сои. Образцы промывали средой 5 раз по 10 минут, как описано выше. Общий белок экстрагировали Из одной целой лунки с обработанными протопластами и проводили вестерн-блоттинг в отношении GFP (ab1218, Abcam), при этом для контроля загрузки применяли актин (ab197345, Abcam). Относительную экспрессию GFP нормализовали по актину и сравнивали между обработками с помощью загруженных плазмид PMP, составами и контролями.

Кроме того, 10 мкл промытых протопластов помещали на предметное стекло и исследовали в отношении экспрессии GFP с помощью флуоресцентной микроскопии (EVOS2 FL).

В протопластах, обработанных загруженных плазмидами PMP, и контролях гистохимическую локализацию активности GUS анализировали после инкубирования протопластов в буфере X-gluc (буфер на основе 50 мМ фосфата натрия, pH 7,0, 10 мМ EDTA, 0,1% Triton X-100, 0,5 мМ ферроцианида калия и 2 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолилглюкуронида (X-gluc)) при 37°C в течение 12 ч. Светлопольные изображения получали с применением EVOS2 FL.

PMP из BY-2, загруженные плазмидами pCambia1303, осуществляли функциональную доставку своего полезного груза в протопласты и приводили к успешной транскрипции репортерных белков, закодированных в плазмиде.

Пример 9. Получение PMP из фруктового сока, полученного с помощью измельчения, с применением ультрацентрифугирования и очистки в градиенте сахарозы

В этом примере описано получение PMP из плодов путем измельчения плода и использования комбинации последовательного центрифугирования для удаления остатков, ультрацентрифугирования для осаждения неочищенных PMP и использования градиента плотности сахарозы для очистки PMP. В этом примере в качестве модельного плода использовали грейпфрут.

а) Получение PMP из грейпфрута с помощью ультрацентрифугирования и очистки в градиенте плотности сахарозы

Технологический процесс получения PMP из грейпфрута с применением измельчителя, ультрацентрифугирования и очистки в градиенте сахарозы показан на фиг. 1A. Один красный грейпфрут приобретали в местном магазине сети Whole Foods Market® и в нем удаляли альбедо, флаведо и сегментные мембраны для сбора соковых мешочков, которые гомогенизировали с применением измельчителя на максимальной скорости в течение 10 минут. Сто мл сока разбавляли в 5x с помощью PBS с последующим центрифугированием при 1000 x g в течение 10 минут, 3000 x g в течение 20 минут и 10000 x g в течение 40 минут для удаления крупных остатков. 28 мл очищенного сока подвергали ультрацентрифугированию на микро-ультрацентрифуге Sorvall™ MX 120 Plus при 150000 x g в течение 90 минут при 4°C с использованием колебательного ротора со стаканами S50-ST (4×7 мл) для получения осадка неочищенных PMP, который ресуспендировали в PBS, pH 7,4. Затем готовили градиент сахарозы в Tris-HCL, pH 7,2,

неочищенные PMP наслаивали поверх градиента сахарозы (сверху вниз: 8, 15. 30, 45 и 60% сахарозы) и подвергали ультрацентрифугированию при 150000 x g в течение 120 минут при 4°C с применением колебательного ротора со стаканами S50-ST (4×7 мл). Собирали фракции по одному мл и PMP собирали на границе раздела 30-45%. Фракции промывали с помощью PBS путем ультрацентрифугирования при 150000 x g в течение 120 минут при 4°C и осадки растворяли в минимальном количестве PBS.

Концентрацию PMP (1×10^9 PMP/мл) и медианный размер PMP (121,8 нм) определяли с помощью анализатора частиц Spectradyne nCS1™ с применением картриджа TS-400 (фиг. 1B). Дзета-потенциал определяли с применением Zetasizer Ultra от Malvern и он составлял -11,5 +/- 0,357 мВ.

В этом примере продемонстрировано, что PMP из грейпфрута можно выделять с использованием ультрацентрифугирования в комбинации с методами очистки в градиенте сахарозы. Однако этот способ индуцировал сильное гелеобразование в образцах на всех этапах получения PMP и в конечном растворе PMP.

Пример 10. Получение PMP из фруктового сока, полученного прессованием на сетке, с применением ультрацентрифугирования и очистки в градиенте сахарозы

В этом примере описано снижение содержания контаминантов, представляющих собой клеточную стенку и клеточную мембрану, в ходе процесса получения PMP с применением более мягкого процесса отжима сока (применения дуршлага-сита). В этом примере в качестве модельного плода использовали грейпфрут.

а) Мягкий отжим сока снижает гелеобразование в ходе получения PMP на основе PMP из грейпфрута

Соковые мешочки выделяли из красного грейпфрута, как описано в примере 9. Чтобы уменьшить гелеобразование в ходе получения PMP, вместо использования деструктивного способа измельчения соковые мешочки осторожно прижимали к сетке чайного ситечка для сбора сока и уменьшения содержания контаминантов, представляющих собой клеточную стенку и клеточную мембрану. После дифференциального центрифугирования сок был более прозрачным, чем после использования измельчителя, и после центрифугирования в градиенте плотности сахарозы наблюдали одну чистую полосу сахарозы, содержащую PMP, на границе 30-45% (фиг. 2). В ходе и после получения PMP общий уровень гелеобразование был меньшим.

Данные авторов настоящего изобретения показывают, что применение стадии мягкого отжима сока снижало уровень гелеобразования, вызванного контаминантами, в ходе получения PMP по сравнению со способом, предусматривающим измельчение.

Пример 11. Получение PMP с применением ультрацентрифугирования и эксклюзионной хроматографии

В этом примере описано получение PMP из плодов с применением ультрацентрифугирования (UC) и эксклюзионной хроматографии (SEC). В этом примере в качестве модельного плода использовали грейпфрут.

а) Получение PMP из грейпфрута с применением UC и SEC

Соковые мешочки выделяли из красного грейпфрута, как описано в примере 9a, и осторожно прижимали к сетке чайного ситечка со сбором 28 мл сока. Технологический процесс получения PMP из грейпфрута с применением UC и SEC изображен на фиг. 3A. Вкратце, сок подвергали дифференциальному центрифугированию при 1000 x g в течение 10 минут, 3000 x g в течение 20 минут и 10000 x g в течение 40 минут для удаления крупных остатков.

28 мл очищенного сока подвергали ультрацентрифугированию на микро-ультрацентрифуге Sorvall™ MX 120 Plus при 100000 x g в течение 60 минут при 4°C с колебательного ротора со стаканами S50-ST (4×7 мл) для получения осадка неочищенных PMP, который ресуспендировали в буфере MES (20 мМ MES, NaCl, pH 6). После двукратной промывки осадков буфером MES конечный осадок ресуспендировали в 1 мл PBS, pH 7,4. Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие PMP. Фракции, элюированные в ходе SEC, анализировали с помощью нанопроточной цитометрии с помощью NanoFCM для определения размера и концентрации PMP с применением стандартов концентрации и размеров, предоставленных производителем. Кроме того, для фракций, полученных в ходе SEC, определяли поглощение при 280 нм (SpectraMax®) и концентрацию белка (BCA-анализ Pierce™, ThermoFisher), чтобы идентифицировать, в каких фракциях элюировались PMP (фиг. 3B-3D). Фракции 2-4, полученные в ходе SEC, идентифицировали как фракции, содержащие PMP. Анализ фракций, элюирующихся более рано и позднее, показал, что фракция 3, полученная в ходе SEC, является основной фракцией, содержащей PMP, при этом концентрация составляет $2{,}83\times10^{11}$ PMP/мл (57,2% всех частиц в диапазоне размеров 50-120 нм) и медианный размер составляет 83,6 нм +/- 14,2 нм (SD). Хотя поздно элюирующиеся фракции 8-13 характеризовались очень низкой концентрацией частиц, как показано с помощью NanoFCM, в этих фракциях с помощью BCA-анализа обнаруживали белковые контаминанты.

Данные авторов настоящего изобретения показывают, что TFF и SEC можно применять для отделения очищенных PMP от поздно элюирующихся контаминантов, и что комбинация способов анализа, применяемая в данном документе, позволяет отличить фракции PMP от поздно элюирующихся контаминантов.

Пример 12. Крупномасштабное получение PMP с использованием фильтрации в тангенциальном потоке и эксклюзионной хроматографии в комбинации с EDTA/диализом для снижения содержания контаминантов

В этом примере описано крупномасштабное получение PMP из плодов с использованием фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) и эксклюзионной хроматографии (SEC) в комбинации с инкубацией с EDTA для уменьшения образования макромолекул пектина и диализом на протяжении ночи для снижения содержания контаминантов. В этом примере в качестве модельного плода использовали грейпфрут.

а) Получение PMP из грейпфрута с использованием TFF и SEC

Красные грейпфруты приобретали в местном магазине сети Whole Foods Market® и

1000 мл сока выделяли с применением пресса для отжима сока. Технологический процесс получения PMP из грейпфрута с применением TFF и SEC изображен на фиг. 4A. Сок подвергали дифференциальному центрифугированию при 1000 x g в течение 10 минут, 3000 x g в течение 20 минут и 10000 x g в течение 40 минут для удаления крупных остатков. Очищенный грейпфрутовый сок концентрировали и один раз промывали с применением TFF (размер пор 5 нм) с получением 2 мл (в 100x раз). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие PMP. Фракции, элюированные в ходе SEC, анализировали с помощью нанопроточной цитометрии с помощью NanoFCM для определения концентрации PMP с применением стандартов концентрации и размеров, предоставленных производителем. Кроме того, для фракций, полученных в ходе SEC, определяли концентрацию белка (BCA-анализ Pierce™, ThermoFisher) для идентификации фракций, в которых элюировались PMP. При крупномасштабном получении из 1 литра сока (концентрированного в 100x раз) также подверглось концентрированию большое количество контаминантов в поздних фракциях, полученных в ходе SEC, как можно было обнаружить с помощью BCA-анализа (фиг. 4B, верхняя панель). Суммарный общий выход PMP (фиг. 4B, нижняя панель) при крупномасштабном получении был ниже по сравнению с выделением из одного грейпфрута, что могло указывать на потерю PMP.

b) Снижение содержания контаминантов за счет инкубации с EDTA и диализа

Красные грейпфруты приобретали в магазине сети Whole Foods Market® и 800 мл сока выделяли с применением пресса для отжима сока. Сок подвергали дифференциальному центрифугированию при 1000 x g в течение 10 минут, 3000 x g в течение 20 минут и 10000 x g в течение 40 минут для удаления крупных остатков и фильтровали через фильтр с размером пор 1 мкм и 0,45 мкм для удаления крупных частиц. Подвергнутый грубой очистке грейпфрутовый сок разделяли на 4 различные группы обработки, каждая из которых содержала по 125 мл сока. Группу обработки 1 обрабатывали, как описано в примере 12a, концентрировали и промывали (PBS) до конечной концентрации 63x, а также подвергали SEC. Перед проведением TFF 475 мл сока инкубировали с EDTA в конечной концентрации 50 мМ, pH 7,15, в течение 1,5 часа при к. т., чтобы обеспечить образование хелатных соединений железа и снижения образования макромолекул пектина. После этого сок разделяли на три группы обработки, которые подвергали концентрированию посредством TFF с промывкой с помощью либо PBS (без кальция/магния) pH 7,4, либо MES pH 6, либо Tris pH 8,6, до конечной концентрации сока 63X. Затем образцы подвергали диализу в том же промывочном буфере на протяжении ночи при 4°C с применением мембраны с отсечением 300 кДа и подвергали SEC. По сравнению с высоким пиком контаминантов во фракциях позднего элюирования в контроле с только TFF инкубация с EDTA с последующим диализом на протяжении ночи приводила к значительному снижению содержания контаминантов, о чем свидетельствует анализ поглощения при 280 нм (фиг. 4C) и BCA-анализ белков (фиг. 4D), который чувствителен к присутствию сахаров и пектинов. Разница между

используемыми для диализа буферами (PBS без кальция/магния pH 7,4, MES pH 6, Tris pH 8,6) отсутствовала.

Данные авторов настоящего изобретения показывают, что инкубация с EDTA с последующим диализом снижала количество контаминантов, совместно получаемых при очистке, что облегчает крупномасштабное получение PMP.

Пример 13. Получение PMP из среды для культивирования клеток растений

В этом примере описано получение PMP из культуры растительных клеток. В этом примере линию клеток Black Mexican Sweet (BMS) Zea mays использовали в качестве модельной линии растительных клеток.

*а) Получение PMP из линии клеток BM*S Zea mays

Линию клеток Black Mexican sweet (BMS) Zea mays приобретали в ABRC и выращивали в основной среде Мурасиге-Скуга, pH 5,8, содержащей 4,3 г/л смеси основных солей Мурасиге-Скуга (Sigma M5524), 2% сахарозы (S0389, Millipore Sigma), 1x раствор витаминов MS (M3900, Millipore Sigma), 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (D7299, Millipore Sigma) и 250 мкг/л тиамина HCL (V-014, Millipore Sigma), при 24°C с перемешиванием (110 об/мин) и пересевали из расчета 20% объема/объем каждые 7 дней.

Через три дня после пересева 160 мл клеток BMS собирали и центрифугировали при 500 x g в течение 5 мин для удаления клеток и 10000 x g в течение 40 мин для удаления крупных остатков. Среду пропускали через фильтр с размером пор 0,45 мкм для удаления крупных частиц, и профильтрованную среду концентрировали и промывали (100 мл буфера MES, 20 мМ MES, 100 мМ NaCL, pH 6) посредством TFF (размер пор 5 нм) с получением 4 мл (в 40x раз). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие PMP, которые анализировали с помощью NanoFCM для определения концентрации PMP, определения поглощения при 280 нм (SpectraMax®) и анализа концентрации белка (BCA-анализ Pierce™, ThermoFisher) для подтверждения фракций, содержащих PMP, и поздних фракций, содержащих контаминанты (фиг. 5A-5C). Фракции 4-6, полученные в ходе SEC, содержали очищенные PMP (фракции 9-13 содержали контаминанты) и их объединяли вместе. Конечную концентрацию PMP (2,84 x 10^{10} PMP/мл) и медианный размер PMP (63,2 нм +/- 12,3 нм SD) в объединенных фракциях, содержащих PMP, определяли с помощью NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем (фиг. 5D-5E).

Эти данные показывают, что PMP можно выделять, очищать и концентрировать из жидких сред для культивирования растительных клеток.

Пример 14. Поглощение PMP растительными клетками

В этом примере описана способность PMP связываться с растительными клетками и поглощаться ими. В этом примере PMP из лимона применяли в качестве модельного PMP, а линии клеток сои, пшеницы и кукурузы применяли в качестве модельных растительных клеток.

a) Получение PMP из грейпфрута с использованием TFF в комбинации с SEC

Красные органические грейпфруты (Флорида) приобретали в местном магазине сети Whole Foods Market®. Один литр грейпфрутового сока собирали с применением пресса для отжима сока и затем центрифугировали при 3000 x g в течение 20 минут, а затем при 10000 x g в течение 40 минут для удаления крупных остатков. Затем добавляли 500 мМ EDTA, pH 8,6, до конечной концентрации 50 мМ EDTA, pH 7, и раствор инкубировали в течение 30 минут, чтобы обеспечить образование хелатных соединений кальция и предотвратить образование макромолекул пектина. Впоследствии сок пропускали через фильтры с размерами пор 11 мкм, 1 мкм и 0,45 мкм для удаления крупных частиц. Отфильтрованный сок концентрировали и промывали (500 мл PBS) посредством фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) (размер пор 5 нм) до 400 мл (в 2,5x раза) и подвергали диализу на протяжении ночи в PBS, pH 7,4 (с одной заменой среды) с применением мембраны для диализа с отсечением 300 кДа для удаления контаминантов. Затем подвергнутый диализу сок дополнительно концентрировали посредством TFF до конечной концентрации в объеме 50 мл (в 20x раз). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие PMP, которые анализировали в отношении поглощения при 280 нм (SpectraMax®) и подвергали анализу концентрации белка (BCA-анализ Pierce™, ThermoFisher) для подтверждения фракций, содержащих PMP, и поздних фракций, содержащих контаминанты. Фракции 4-6, полученные в ходе SEC, содержащие очищенные PMP (фракции 8-14 содержали контаминанты), объединяли вместе и подвергали стерилизации фильтрованием путем последовательной фильтрации с применением шприцевых фильтров с размером пор 0,8 мкм, 0,45 мкм и 0,22 мкм. Конечную концентрацию PMP ($1{,}32\times10^{11}$ PMP/мл) и медианный размер PMP (71,9 нм +/- 14,5 нм) в объединенных простерилизованных фракциях, содержащих PMP, определяли с помощью NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем.

b) Получение PMP из лимона с использованием TFF в комбинации с SEC

Лимоны приобретали в местном магазине сети Whole Foods Market®. Один литр лимонного сока собирали с применением пресса для отжима сока и затем центрифугировали при 3000 x g в течение 20 минут, а затем при 10000 x g в течение 40 минут для удаления крупных остатков. Затем добавляли 500 мМ EDTA, pH 8,6, до конечной концентрации 50 мМ EDTA, pH 7, и раствор инкубировали в течение 30 минут, чтобы обеспечить образование хелатных соединений кальция и предотвратить образование макромолекул пектина. Впоследствии сок пропускали через фильтр для кофе, фильтры с размером пор 1 мкм и 0,45 мкм для удаления крупных частиц. Отфильтрованный сок концентрировали посредством фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) (размер пор 5 нм) до 400 мл (концентрировали в 2,5x раза) и подвергали диализу на протяжении ночи в PBS, pH 7,4, с применением мембраны для диализа с отсечением 300 кДа для удаления контаминантов. Затем подвергнутый диализу сок

дополнительно концентрировали посредством TFF до конечной концентрации в объеме 50 мл (в 20х раз). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие PMP, которые анализировали в отношении поглощения при 280 нм (SpectraMax®) и подвергали анализу концентрации белка (BCA-анализ Pierce™, ThermoFisher) для подтверждения фракций, содержащих PMP, и поздних фракций, содержащих контаминанты. Фракции 4-6, полученные в ходе SEC, содержащие очищенные PMP (фракции 8-14 содержали контаминанты), объединяли вместе и подвергали стерилизации фильтрованием путем последовательной фильтрации с применением шприцевых фильтров с размером пор 0,8 мкм, 0,45 мкм и 0,22 мкм. Конечную концентрацию PMP ($2,7\times10^{11}$ PMP/мл) и медианный размер PMP (70,7 нм +/- 15,8 нм) в объединенных простерилизованных фракциях, содержащих PMP, определяли с помощью NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем.

c) Мечение PMP из лимона NHS-эфиром Alexa Fluor 488

PMP из лимона получали, как описано в примере 14b. PMP метили NHS-эфиром Alexa Fluor 488® (Life Technologies, ковалентный краситель для мембран (AF488)). Вкратце, AF488 растворяли в DMSO до конечной концентрации 10 мг/мл, 200 мкл PMP (1,53E+13 PMP/мл) смешивали с 5 мкл красителя, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере, меченые PMP промывали 2-3 раза с помощью ультрацентрифуги при 100000 x g в течение 1 часа при 4°C. Осадки ресуспендировали с помощью 1,5 мл воды UltraPure. Для контроля наличия потенциальных агрегатов красителя в соответствии с той же процедурой готовили контрольный образец, содержащий только краситель, при этом добавляли 200 мкл воды UltraPure вместо PMP. Конечный осадок AF488-меченных PMP и контроля, содержащего только краситель AF488, ресуспендировали в минимальном количестве воды UltraPure и определяли характеристики с помощью NanoFCM. Конечная концентрация 488-меченных PMP из лимона составляла $2,91\times10^{12}$ PMP/мл, при этом медианный размер AF488-PMP составлял 79,4 нм +/- 14,7 нм, а эффективность мечения составляла 89,4% (фиг. 6A).

d) Поглощение AF488-меченных PMP из лимона растительными клетками

Линии растительных клеток приобретали в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (*Glycine max, №* PC-1026; *Triticum aestivum, №* PC-998) и ABRC (Black Mexican sweet (BMS) Zea mays), и их выращивали в вентилируемых 250-мл колбах с перегородками в темноте при 24°C и перемешивании (110 об/мин). Glycine max и Triticum aestivum выращивали в среде на основе 3,2 г/л основной среды Гамборга B-5 с добавлением минимального количества органических веществ (G5893, Millipore Sigma), pH 5,5, с добавлением 2% сахарозы и 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4D) (D7299, Millipore Sigma) в соответствии с инструкциями поставщика. Клетки BMS выращивали в базовой среде Мурасиге-Скуга, pH 5,8, содержащей 4,3 г/л смеси основных солей Мурасиге-Скуга (Sigma M5524), 2% сахарозы (S0389, Millipore Sigma), 1x раствор витаминов MS (M3900, Millipore Sigma), 2

мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (D7299, Millipore Sigma) и 250 мкг/л тиамина-HCL (V-014, Millipore Sigma).

Для обработки с помощью AF488-PMP отбирали 5 мл суспензий клеток для определения общего объема клеток в процентах (PCV). PCV определяли как объем клеток, деленный на общий объем аликвоты культуры клеток, и выражали в процентах. Клетки центрифугировали в течение 5 мин при 3900 об/мин и определяли объем клеточного осадка. % PCV для BMS, Glycine max, and Triticum aestivum составлял 20%, 15% и 18% соответственно. Для эксперимента с поглощением % PCV культур доводили до 2% путем разбавления клеток в их соответствующей среде. Затем 125 мкл суспензий растительных клеток добавляли в 24-луночный планшет, и образцы в двойных повторностях обрабатывали с помощью 125 мкл буфера MES (200 мМ MES+10 мМ NaCl, pH 6) самого по себе (отрицательный контроль), красителя AF488 самого по себе (контроль обработки только красителем) или конечной концентрации 1×10^{12} AF488-PMP/мл, разведенных в буфере MES до 125 мкл. Клетки инкубировали в течение 2 часов при 24°C в темноте, трижды промывали 1 мл буфера MES для удаления AF488-PMP или свободного красителя, которые не были захвачены, и ресуспендировали в 300 мкл буфера MES для визуализации на эпифлуоресцентном микроскопе (EVOS FL Auto 2, Invitrogen). По сравнению с контролем обработки только красителем AF488, который не характеризовался обнаруживаемой флуоресценцией, во всех линиях растительных клеток можно было обнаружить сигнал флуоресценции различной интенсивности, что указывает на поглощение PMP (фиг. 6B). Клетки Triticum aestivum демонстрировали самый сильный сигнал флуоресценции, что указывало на то, что из трех исследованных линий растительных клеток они характеризовались наиболее высоким уровнем поглощения AF488-меченных PMP из лимона.

Данные авторов настоящего изобретения показывают, что PMP могли захватываться растительными клетками in vitro.

Пример 15. Поглощение PMP растениями

В этом примере описано поглощение и системный транспорт PMP in planta. В этом примере PMP из грейпфрута, лимона и проростков Arabidopsis thaliana применяли в качестве модельных PMP, а проростки растения рода Arabidopsis и ростки люцерны применяли в качестве модельных растений.

а) Мечение PMP из лимона и грейпфрута NHS-эфиром DyLight 800

PMP из грейпфрута и лимона получали, как описано в примерах 14a и 14b. PMP метили ковалентным красителем для мембран (DyL800), представляющим собой NHS-эфир DyLight 800 (Life Technologies, № 46421). Вкратце, Dyl800 растворяли в DMSO до конечной концентрации 10 мг/мл, 200 мкл PMP смешивали с 5 мкл красителя, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере, и меченые PMP промывали 2-3 раза с помощью ультрацентрифугирования при 100000 x g в течение 1 ч при 4°C и осадки ресуспендировали в 1,5 мл воды UltraPure. Для контроля наличия потенциальных агрегатов красителя в соответствии с той же процедурой готовили

контрольный образец, содержащий только краситель, при этом добавляли 200 мкл воды UltraPure вместо PMP. Конечный осадок DyL800-меченных PMP и контроль, содержащий только краситель DyL800, ресуспендировали в минимальном количестве воды UltraPure и определяли характеристики с помощью NanoFCM. Конечная концентрация DyL800-меченных PMP из грейпфрута составляла $4{,}44\times10^{12}$ PMP/мл, а DyL800-меченных PMP из лимона составляла $5{,}18\times10^{12}$ PMP/мл. Эффективность мечения невозможно было определить с помощью NanoFCM, поскольку он не выявляет инфракрасное излучение.

b) Прорастание и рост проростков Arabidopsis thaliana

Семена Arabidopsis thaliana Col-0 дикого типа получали из ABRC и подвергали поверхностной стерилизации 70% этанолом, инкубации с 50% отбеливателем/0,1% Triton X-100 в течение 10 минут и 4 промывкам стерильной ddH_2O для удаления раствора отбеливателя. Семена подвергали стратификации в течение 1 дня при 4°C в темноте. В планшете площадью 100 $см^2$ (предварительно покрыт 0,5% раствором фетальной телячьей сыворотки в воде), содержащем 20 мл 0,5x среды MS (2,15 г/л солей Мурасиге-Скуга, 1% сахарозы, pH 5,8), герметизированном с помощью хирургической ленты 3M, проращивали примерно 250 семян, и их выращивали в инкубаторе с фотопериодом 16 ч света при 23°C/8 ч темноты при 21°C.

c) Поглощение DyL800-меченных PMP из грейпфрута, лимона и At растениями Arabidopsis thaliana *и люцерны*

Для оценки того, могут ли PMP захватываться и транспортироваться системным путем in planta, проростки растения рода Arabidopsis проращивали в жидкой культуре, как описано в примере 15b, на верхней стороне сетчатого фильтра, чтобы обеспечить прорастание корней сквозь сетку и обеспечить частичное воздействие раствора PMP на проростки At. Ростки люцерны приобретали в местном супермаркете. 9-дневные проростки растения рода Arabidopsis и ростки люцерны обрабатывали с помощью 0,5 мл раствора, содержащего воду (отрицательный контроль), только краситель DyL800 (контроль обработки красителем), DyL800-меченные PMP из грейпфрута ($1{,}6\times10^{10}$ PMP/мл) или PMP из лимона ($5{,}1\times10^{10}$ PMP/мл) в 0,5x среде MS, путем частичного воздействия на корни (проростки At в сетке плавали в растворе PMP, или в случае проростков люцерны путем частичного воздействия на корни в 1,5 мл-пробирке Eppendorf) в течение 22 или 24 часов соответственно при 23°C. Затем растения 3 раза промывали средой MS и проводили визуализацию с помощью инфракрасного сканера Odyssey® CLx (Li-Cor).

По сравнению с отрицательным контролем (небольшая степень автофлуоресценции у листьев ростков люцерны) и контролем обработки только красителем для всех PMP, полученных из разных источников, продемонстрирован сигнал флуоресценции (белый цвет означает интенсивный сигнал флуоресценции, черный цвет означает отсутствие сигнала) как в проростках растения рода Arabidopsis, так и в ростках люцерны, что указывает на захват PMP обоими растениями (фиг. 7). Наличие сигнала флуоресценции в листьях растения рода Arabidopsis или участках стеблей люцерны,

которые не подвергались воздействию раствора PMP, указывало на активный транспорт PMP in planta. Поскольку концентрации средств для обработки, содержащих DyL800, в этом эксперименте не были нормализованы, было невозможно оценить отличия в эффективности поглощения в зависимости от источника/мишени.

Данные авторов настоящего изобретения показали, что PMP, полученные из различных растительных источников, могли захватываться и транспортироваться in planta.

Пример 16. Обработка проростков Arabidopsis thaliana с помощью PMP из грейпфрута, загруженных DOX

В этом примере описана загрузка PMP низкомолекулярным соединением для обеспечения снижения приспособленности растения. В этом примере доксорубицин применяли в качестве модельного низкомолекулярного соединения, а Arabidopsis thaliana применяли в качестве модельного растения. Доксорубицин представляет собой цитотоксический антрациклиновый антибиотик, выделенный из культур Streptomyces peucetius var. caesius. Доксорубицин взаимодействует с ДНК путем интеркаляции и ингибирует как репликацию ДНК, так и транскрипцию РНК. Было показано, что доксорубицин является цитотоксичным для растений (Culiarez-Mac et al, Plant Growth Regulation, (5): 155-164, 1987.

Эффективные и безопасные гербициды необходимы для предотвращения значительных потерь урожая из-за сорняков с одновременной защитой окружающей среды от токсичных побочных эффектов, связанных с чрезмерным использованием гербицидов.

а) Получение PMP из грейпфрута с использованием TFF в комбинации с SEC

Красные органические грейпфруты приобретали в местном магазине сети Whole Foods Market®. Четыре литра грейпфрутового сока собирали с применением пресса для отжима сока, pH доводили до pH 4 с помощью NaOH, инкубировали с 1 Ед/мл пектиназы (Sigma, 17389) для удаления пектиновых контаминантов и затем центрифугировали при 3000 g в течение 20 минут, а затем при 10000 g в течение 40 минут для удаления крупных остатков. Затем обработанный сок инкубировали с 500 мМ EDTA, pH 8,6, в конечной концентрации 50 мМ EDTA, pH 7,7, в течение 30 минут, чтобы обеспечить образование хелатных соединений кальция и предотвратить образование макромолекул пектина. Впоследствии сок, обработанный EDTA, пропускали через фильтр с размером пор 11 мкм, 1 мкм и 0,45 мкм для удаления крупных частиц. Отфильтрованный сок промывали и концентрировали посредством фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) с использованием мембраны для TFF с отсечением 300 кДа. Сок концентрировали в 5х раз, после чего выполняли промывку 6 объемами с заменой на PBS и дополнительно фильтровали до конечной концентрации 198 мл (в 20х раз). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие PMP, которые анализировали в отношении поглощения при 280 нм (SpectraMax®) и концентрации белка (BCA-анализ Pierce™, ThermoFisher) для

подтверждения фракций, содержащих PMP, и поздних фракций, содержащих контаминанты. Фракции 3-7, полученные в ходе SEC, содержали очищенные PMP (фракции 9-12 содержали контаминанты), объединяли вместе, подвергали стерилизации фильтрованием путем последовательной фильтрации с применением шприцевых фильтров с размером пор 0,8 мкм, 0,45 мкм и 0,22 мкм и дополнительно концентрировали путем осаждения PMP в течение 1,5 часа при 40000 x g и ресуспендирования осадка в 4 мл дистиллированный воды UltraPure™, не содержащей ДНКазы/РНКазы (ThermoFisher, 10977023). Конечную концентрацию PMP ($7,56\times10^{12}$ PMP/мл) и средний размер PMP (70,3 нм +/- 12,4 нм SD) определяли посредством NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем. Полученные PMP из грейпфрута использовали для загрузки доксорубицина.

b) Загрузка доксорубицина в PMP из грейпфрута

PMP из грейпфрута, полученные в примере 16a, использовали для загрузки доксорубицина (DOX). Исходный раствор доксорубицина (Sigma PHR1789) получали в концентрации 10 мг/мл в воде UltraPure и стерилизовали фильтрованием (0,22 мкм). Стерильные PMP из грейпфрута (3 мл при концентрации частиц $7,56\times10^{12}$ PMP/мл) смешивали с 1,29 мл раствора DOX. Конечная концентрация DOX в смеси составляла 3 мг/мл. Смесь обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин на бане для обработки ультразвуком (Branson 2800) с повышением температуры до 40°C и выдерживали на бане дополнительные 15 минут без обработки ультразвуком. Смесь перемешивали в течение 4 часов при 24°C, 100 об/мин, в темноте. Затем смесь экструдировали с применением мини-экструдера Avanti (Avanti Lipids). Чтобы уменьшить количество липидных бислоев и общий размер частиц, PMP, загруженные DOX, экструдировали посредством способа со ступенчатым уменьшением размера отверстий: 800 нм, 400 нм и 200 нм. Подвергнутый экструдированию образец стерилизовали фильтрованием путем последовательного пропускания через фильтр с размером пор 0,8 мкм и 0,45 мкм (Millipore, диаметр 13 мм) в вытяжном шкафу для ТС. Для удаления не загруженного или слабо связавшегося DOX образец очищали с применением подхода на основе ультрацентрифугирования. В частности, образец центрифугировали при 100000 x g в течение 1 ч при 4°C в ультрацентрифужных 1,5-мл пробирках. Супернатант собирали для дополнительного анализа и хранили при 4°C. Осадок ресуспендировали в стерильной воде и ультрацентрифугировали в тех же условиях. Эту стадию повторяли четыре раза. Конечный осадок ресуспендировали в стерильной воде UltraPure и хранили при 4°C до дальнейшего использования.

Далее определяли концентрацию частиц и загрузочную емкость PMP. Общее количество PMP в образце ($4,76\times10^{12}$ PMP/мл) и средний размер частиц (72,8 нм +/- 21 нм SD) определяли с применением NanoFCM. Концентрацию DOX оценивали путем измерения интенсивности флуоресценции (Ex/Em=485/550 нм) с применением спектрофотометра SpectraMax®. Калибровочную кривую получали га основании растворов свободного DOX от 0 до 50 мкг/мл в стерильной воде. Чтобы разделить PMP,

загруженные DOX, и комплексы DOX (π-π стекирование), образцы и стандарты инкубировали с 1% SDS при 37°C в течение 45 мин перед измерениями флуоресценции. Загрузочную емкость (пг DOX на 1000 частиц) рассчитывали как концентрацию DOX (пг/мл), деленную на общее количество PMP (PMP/мл). Загрузочная емкость PMP-DOX составляла 1,2 пг DOX на 1000 PMP. Однако следует отметить, что эффективность загрузки (% PMP, загруженных DOX, по сравнению с общим количеством PMP) не могли оценить, поскольку спектр флуоресценции DOX нельзя выявлять на NanoFCM.

c) Обработка проростков Arabidopsis thaliana *с помощью PMP, загруженных доксорубицином*

PMP из грейпфрута получали и загружали доксорубицином, как описано в примерах 16a и 16b. Семена Arabidopsis thaliana Col-0 дикого типа получали из ABRC, подвергали поверхностной стерилизации с помощью 50% отбеливателя, стратификации в течение 1-3 дней при 4°C и проращивали на среде Мурасиге-Скуга (MS) половинной концентрации (0,5x), дополненной 0,5% сахарозы, 2,5 мМ MES, pH 5,6, содержащей 0,8% агара, при применении фотопериода 16 ч света при 23°C/8 ч темноты при 21°C.

Для проверки того, могут ли PMP доставлять груз, представляющий собой низкомолекулярное соединение, in planta, 7-дневные проростки Arabidopsis thaliana переносили в 0,5X жидкую среду MS в 24-луночном планшете (1 проросток на лунку) и обрабатывали свободным DOX или PMP, загруженными DOX, с дозой инкапсулированного DOX, составляющей 0 (отрицательный контроль), 25 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ. Планшет покрывали алюминиевой фольгой и инкубировали в течение 24 часов. Среду, содержащую DOX, удаляли, проростки промывали два раза ½X средой MS и добавляли свежую среду. Проростки инкубировали в течение дополнительных 3 дней при нормальном фотопериоде (16 ч света при 23°C/8 ч темноты при 21°C). Затем проростки извлекали из планшета и сушили на полотенце для проведения визуализации, а цитотоксичность оценивали с помощью анализа жизнеспособности листьев, цвета листьев и длины корней. Цитотоксичность определяли по укорочению корней, потере жизнеспособности листьев и обесцвечиванию листьев (желтые вместо зеленых) по сравнению с контрольными необработанными проростками. По сравнению со свободным DOX, который проявлял цитотоксичность только при 100 мкМ DOX (укорочение корней и обесцвечивание листьев), PMP, нагруженные DOX, были цитотоксичными при 50 мкМ и 100 мкМ DOX. У проростков, обработанных 50 мкМ PMP-DOX, наблюдали сильное пожелтение листьев при пониженной жизнеспособности листьев и укорочении корней. Данные авторов настоящего изобретения показали, что PMP можно загружать, и они могут доставлять низкомолекулярное соединение in planta, и что PMP, загруженные доксорубицином, были в два раза эффективнее в индуцировании цитотоксического ответа, чем свободный доксорубицин.

Пример 17. Поглощение обработанных пектиназой PMP ростками люцерны

В этом примере описано, что удаление пектинов во время производства PMP не оказывает воздействие на их поглощение и системный транспорт in planta. В этом примере

PMP ИЗ лимона применяли в качестве модельных PMP, а ростки люцерны применяли в качестве модельных растений.

a) Получение PMP из лимона с добавлением или без добавления пектиназы

Лимоны приобретали в местном магазине сети Whole Foods Market®. Лимонный сок (1260 мл) собирали с применением пресса для отжима сока и разделяли на две фракции. 630 мл сока оставляли интактными, а 630 мл доводили до pH 4 с помощью NaOH и инкубировали с 6 Ед/мл пектиназы (Sigma, 17389) в течение 1,45 ч при комнатной температуре. Затем сок, обработанный пектиназой, и необработанный сок центрифугировали при 3000 g в течение 20 минут, а затем при 10000 g в течение 40 минут для удаления крупных остатков. Затем обработанный сок инкубировали с 500 мМ EDTA, pH 8,6, в конечной концентрации 50 мМ EDTA, pH 7,19-7,25, в течение 30 минут при комнатной температуре, чтобы обеспечить образование хелатных соединений кальция и предотвратить образование макромолекул пектина. Впоследствии сок, обработанный EDTA, пропускали через фильтр с размером пор 11 мкм, 1 мкм и 0,45 мкм для удаления крупных частиц. Отфильтрованный сок промывали (260 мл PBS во время процедуры TFF) и концентрировали в ~1,6x раза до общего объема 400 мл посредством фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) и подвергали диализу на протяжении ночи в PBS, pH 7,4, с применением мембраны для диализа с отсечением 300 кДа. Затем сок, подвергнутый диализу, дополнительно концентрировали посредством TFF до конечной концентрации 30 мл (в ~21x раз). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию, чтобы элюировать фракции, содержащие PMP, и проводили анализ поглощения при 280 нм (SpectraMax) для распознавания фракций, содержащих PMP, от фракций позднего элюирования, содержащих контаминанты. Фракции 4-6, полученные в ходе SEC (без обработки пектиназой), и фракции 4-7, полученные в ходе SEC (с обработкой пектиназой), содержащие очищенные PMP, объединяли вместе в отдельные группы в зависимости от обработки. Объединенные фракции, полученные в ходе SEC, подвергали диализу в PBS, pH 7,4, с применением мембраны для диализа с отсечением 300 кДа. Образцы стерилизовали путем последовательной фильтрации с применением шприцевых фильтров с размером пор 0,85 мкм, 0,4 мкм и 0,22 мкм и дополнительно концентрировали путем осаждения PMP в течение 1,5 ч при 40000 x g, и, в конечном итоге, осадок ресуспендировали в воде UltraPure. Конечная концентрация PMP для необработанных PMP из лимона составляла $1{,}24\times10^{12}$ PMP/мл и медианный размер PMP составлял 129 нм +/- 12 нм SD; для обработанных пектиназой PMP из лимона конечная концентрация составляла $2{,}26\times10^{12}$ PMP/мл и медианный размер PMP составлял 130 нм +/- 11 нм (SD), как определили посредством нанопроточной цитометрии (NanoFCM) с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем.

b) Мечение PMP из лимона с помощью NHS-эфира DyLight 800

Обработанные и не обработанные пектиназой PMP из лимона метили ковалентным красителем для мембран (DyL800), представляющим собой NHS-эфир DyLight 800 (Life Technologies, № 46421). Вкратце, DyL800 растворяли в DMSO до конечной концентрации

10 мг/мл, 200 мкл PMP смешивали с 5 мкл красителя, инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере и меченые PMP промывали 2-3 раза с помощью ультрацентрифугирования при 100000 x g в течение 1 ч при 4°C, а осадки ресуспендировали в 1,5 мл воды UltraPure. Для контроля наличия потенциальных агрегатов красителя в соответствии с той же процедурой готовили контрольный образец, содержащий только краситель, при этом добавляли 200 мкл воды UltraPure вместо PMP. Конечный осадок DyL800-меченных PMP и контроль, содержащий только краситель DyL800, ресуспендировали в минимальном количестве воды UltraPure и определяли характеристики с помощью NanoFCM. У не обработанных пектиназой Dyl800-меченных PMP из лимона конечная концентрация составляла $3,2\times10^{12}$ PMP/мл, а у обработанных пектиназой DyL800-меченных PMP $5,57\times10^{12}$ PMP/мл. Эффективность мечения невозможно было определить с помощью NanoFCM, поскольку он не выявляет инфракрасное излучение.

с) Обработка ростков люцерны обработанными и не обработанными пектиназой DyL800-PMP

Для того чтобы оценить, влияет ли удаление пектинов во время получения PMP на поглощение PMP, ростки люцерны приобретали в местном супермаркете и обрабатывали их обработанными и не обработанными пектиназой PMP из лимона, меченными DyLight800, водой (отрицательный контроль), только красителем DyLight800nm (контроль для оценки агрегации красителя) в среде Мурасиге-Скуга (MS) половинной концентрации, дополненной 0,5% сахарозы, 2,5 мМ MES, pH 5,6 в течение 21 часа при 23°C (фиг. 8A). Затем проростки промывали 3 раза средой MS и проводили визуализацию с применением инфракрасного сканера Odyssey. Разница в поглощении и транспорте PMP, которые были получены с обработкой пектиназой или без нее, отсутствовала (фиг. 8B).

Пример 18. Модификация PMP с использованием катионных липидов

В этом примере показана способность изменять поверхностный заряд, увеличивать загрузочную емкость и увеличивать клеточное поглощение PMP в клетках растений путем модификации PMP катионными липидами. В этом примере DOTAP (1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан) и DC-холестерин (3ß-[N-(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерин) применяли в качестве модельных катионных липидов, PMP из грейпфрута и лимона в качестве модельных PMP, siRNA/транс-активирующую РНК CRISPR (TracrRNA) в качестве модельного отрицательно заряженного полезного груза, а клетки Black Mexican sweet (BMS) Zea mays (кукурузы) в качестве модельной линию растительных клеток.

Протокол эксперимента

а) Получение PMP из лимона/грейпфрута

Красные органические грейпфруты или желтые органические лимоны приобретали в местном продуктовом магазине. Шесть литров грейпфрутового сока собирали с применением пресса для отжима сока, pH доводили до pH 4 с помощью NaOH, инкубировали с 1 ЕД/мл пектиназы (Sigma, 17389) для удаления пектиновых

контаминантов, а затем центрифугировали при 3000 g в течение 20 минут, а затем при 10000 g в течение 40 минут для удаления крупных остатков. Затем обработанный сок инкубировали с 500 мМ EDTA, pH 8,6, в конечной концентрации 50 мМ EDTA, pH 7,7, в течение 30 минут, чтобы обеспечить образование хелатных соединений кальция и предотвратить образование макромолекул пектина. Впоследствии сок, обработанный EDTA, пропускали через фильтр с размером пор 11 мкм, 1 мкм и 0,45 мкм для удаления крупных частиц. Отфильтрованный сок промывали и концентрировали посредством фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) с использованием мембраны для TFF с отсечением 300 кДа. Сок концентрировали в 10х раз, а затем подвергали диафильтрации в 10 диаобъемах PBS и дополнительно концентрировали до конечной концентрации 120 мл (в 50х раз). Затем авторы настоящего изобретения применяли эксклюзионную хроматографию (SEC), чтобы элюировать фракции, содержащие PMP, которые анализировали в отношении поглощения при 280 нм (SpectraMax®) и концентрации белка (BCA-анализ белка Pierce™) для подтверждения фракций, содержащих PMP, и поздних фракций, содержащих контаминанты. Полученные в ходе SEC фракции 3-7, содержащие очищенные PMP (фракции 9-12 содержали контаминанты), объединяли вместе, стерилизовали фильтрованием путем последовательной фильтрации с применением шприцевых фильтров с размером пор 0,8 мкм, 0,45 мкм и 0,22 мкм и дополнительно концентрировали путем осаждения PMP в течение 1,5 ч при 40000 x g и ресуспендирования осадка в 4 мл дистиллированный воды UltraPure™, не содержащей ДНКазы/РНКазы (ThermoFisher, 10977023). Конечную концентрацию PMP ($7{,}56\times10^{12}$ PMP/мл) и размер PMP (70,3 нм +/- 12,4 нм SD) определяли посредством NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем. Полученные PMP из грейпфрута (GF) или лимона (LM) использовали для экстракции липидов с использованием способа Блая-Дайера, как описано ниже.

b) Модификация PMP катионными липидами

Для получения восстановленных из липидов PMP (LPMP) проводили экстракцию общих липидов из концентрированного раствора PMP из грейпфрута или лимона с использованием способа Блая-Дайера (Bligh and Dyer, J Biolchem Physiol, 37: 911-917, 1959). Вкратце, 1 мл концентрированных PMP (10^{12}-10^{13} PMP/мл) смешивали с 3,5 мл смеси хлороформ:метанол (1:2 об./об.) и хорошо встряхивали на вортексе. Затем добавляли 1,25 мл хлороформа и встряхивали на вортексе, а затем перемешивали с 1,25 мл стерильной воды. В конечном итоге смесь центрифугировали при 300 g в течение 5 минут при к. т. Находящуюся на дне органическую фазу, содержащую липиды, извлекали и высушивали с использованием системы TurboVap® (Biotage®). Чтобы изменить липидный состав природных LPMP, синтетические катионные липиды (DOTAP, DC-холестерин) растворяли в смеси хлороформ:метанол (9:1) и добавляли к экстрагированным липидам PMP до количества 25% или 40% (вес./вес.) от общих липидов с последующим энергичным перемешиванием. Высушенную липидную пленку получали посредством испарения растворителя в потоке инертного газа (например, азота) или

посредством испарения с использованием системы TurboVap® (фиг. 11). Чтобы получить восстановленные PMP из экстрагированных липидов, к высушенной липидной пленке добавляли воду или буфер (например, PBS) и оставляли на 1 ч при к. т. для гидратации. Сформированные липидные частицы подвергали 10 циклам замораживания-оттаивания или обработке ультразвуком (ультразвуковая ванна Branson 2800, 10 мин, к. т.). Затем, чтобы уменьшить количество липидных бислоев и общий размер частиц, липидные PMP экструдировали через поликарбонатные фильтры с размером пор 0,8 мкм, 0,4 мкм и 0,2 мкм с использованием мини-экструдера (Avanti® Polar Lipids) (фиг. 11). Если требовалось получение концентрированных LPMP, образцы концентрировали посредством ультрацентрифугирования при 100000 x g в течение 30 мин при 4°C. Конечный осадок ресуспендировали в стерильной воде UltraPure или PBS и хранили при 4°C до дальнейшего применения. Конечную концентрацию LPMP и медианный размер LPMP (в диапазоне 89-104 нм) определяли посредством NanoFCM с применением стандартов концентрации и размера, предоставленных производителем. Поверхностный заряд (дзета-потенциал) измеряли посредством динамического рассеяния света с использованием Zetasizer (Malvern Panalytical). Диапазон размера и концентраций LPMP составлял 83 ± 19 нм и $1{,}7\times10^{12}$ LPMP/мл для LPMP из LM, 106 ± 25 нм и $6{,}54\times10^{10}$ LPMP/мл для LPMP, модифицированных посредством DOTAP, и 91 ± 17 нм и $3{,}08\times10^{11}$ LPMP/мл для PMP, модифицированных DC-холестерином (фиг. 12). Модификация восстановленных из липидов PMP катионными липидами DOTAP и DC-холестерином изменяла поверхностный заряд LPMP: с увеличением содержания катионных липидов поверхностный заряд LPMP увеличивался (фиг. 13A). Анализ полученных посредством криоэлектронной микроскопии изображений LPMP, восстановленных из экстрагированных липидов лимона, подтвердил сферичность LPMP и гранулометрический состав частиц (68,7 ± 23 нм (SD)) (фиг. 14A и 14B).

c) Загрузка PMP, модифицированных катионным липидом, отрицательно заряженным полезным грузом

Чтобы загрузить siRNA/tracrRNA, к липидам, экстрагированным из GF или LM, добавляли катионные липиды и высушивали, как описано выше. siRNA/tracrRNA, растворенную в не содержащей нуклеаз воде или двухфазном буфере (IDT®), добавляли к высушенной липидной пленке из расчета 1,5 нмоль на 1 мг липидов PMP и оставляли на 1 ч при к. т. для гидратации. Сформированные липидные частицы подвергали 10 циклам замораживания-оттаивания и экструдировали через поликарбонатные фильтры с размером пор 0,8 мкм, 0,4 мкм и 0,2 мкм с использованием мини-экструдера (Avanti® Polar Lipids) (фиг. 11). Загруженные PMP подвергали диализу на протяжении ночи против PBS в диализаторе (Spectrum®) с мембраной с MWCO 100 кДа, а затем стерилизовали с использованием фильтров из полиэфирсульфона (PES) с размером пор 0,2 мкм. Кроме того, образцы очищали и концентрировали с использованием ультрацентрифугирования. Загруженные PMP центрифугировали в течение 30 мин при 100000 x g при 4 °C, супернатант удаляли и осадок ресуспендировали в 1 мл PBS и концентрировали при

100000 x g в течение 30 мин. Полученный осадок ресуспендировали в воде (в случае клеточного поглощения растительными клетками). Размер LPMP, загруженных РНК, и количество частиц оценивали посредством NanoFCM: средний размер и концентрация частиц составляли 89 ± 15 нм и $1,54\times10^{12}$ LPMP/мл для немодифицированных LPMP, 104 ± 25 нм и $2,54\times10^{11}$ LPMP/мл для DC-Chol и 100 ± 30 нм и $9,7\times10^{11}$ LPMP/мл для DOTAP. Загрузку РНК определяли посредством анализа Quant-iT™ RiboGreen™ или посредством измерения интенсивности флуоресценции меченого полезного груза (siRNA, меченной Alexa Fluor 555, или tracrRNA, меченной ATTO 550). Морфологию и размер немодифицированных LPMP также анализировали с помощью криогенной электронной микроскопии (Cryo-EM) (фиг. 14A и 14B). Анализ RiboGreen™ выполняли согласно протоколу производителя в присутствии гепарина (5 мг/мл) и 1% Triton-X100 для лизиса PMP и высвобождения инкапсулированного полезного груза. Модификация LPMP катионными липидами DOTAP и DC-холестерином изменила поверхностный заряд LPMP и повысила загрузку отрицательно заряженным полезным грузом (например, РНК) по сравнению с LPMP без катионных липидов (фиг. 4A-4D).

d) Повышенная доставка РНК в растительные клетки с помощью PMP, модифицированных посредством DC-холестерина

Клетки Black Mexican sweet (BMS) Zea mays приобретали в Центре биологических ресурсов Arabidopsis (ABRC). Клетки BMS выращивали в основной среде Мурасиге-Скуга, pH 5,8, содержащей 4,3 г/л смеси основных солей Мурасиге-Скуга (Sigma M5524), 2% сахарозы (S0389, Millipore Sigma), 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (D7299, Millipore Sigma), 250 мкг/л тиамина-HCl (V-014, Millipore Sigma) и 1x раствор смеси витаминов MS в ddH2O. 1x раствор смеси витаминов содержал ниацин (N0761-100G, Millipore Sigma), пироксидина гидрохлорид (P6280-25G, Millipore Sigma), полукальциевую соль D-пантотеновой кислоты (P5155-100G, Millipore Sigma), L-аспарагин (A4159-25G, Millipore Sigma) и миоинозитол (I7508-100G, Millipore Sigma) при соответствующих конечных концентрациях 1,3 мг/л, 250 мкг/л, 250 мкг/л, 130 мг/л и 200 мг/л. Клетки выращивали в вентилируемых конических стерильных 1-л колбах в темноте при 24°°C при перемешивании (110 об/мин).

Для обработки клеток BMS отбирали по 10 мл клеточных суспензий для определения общего объема клеток в процентах (PCV). PCV определяли как объем клеток, деленный на общий объем аликвоты культуры клеток, и выражали в процентах. Клетки центрифугировали в течение 5 мин при 3900 об/мин и определяли объем клеточного осадка. % PCV для BMS составил 20%. Для эксперимента по поглощению % PCV культур доводили до 4% путем разбавления клеток в среде, как описано выше. В LPMP и LPMP, модифицированные DC-холестерином, загружали tracrRNA, меченную с помощью ATTO 550, как описано выше, стерилизовали и ресуспендировали в стерильной воде. Средний размер и концентрацию частиц анализировали посредством NanoFCM, и они составили 104 ± 25 нм и $2,54\times10^{11}$ LPMP/мл для DC-Chol и 89 ± 15 нм и $1,54\times10^{12}$ LPMP/мл для немодифицированных LPMP. Количество tracrRNA с ATTO 550 (IDT) в образцах

определяли количественно посредством Quant-iT™ RiboGreen®. К аликвоте суспензии растительных клеток объемом 450 мкл в 24-луночном планшете в двух повторностях добавляли по 50 мкл LPMP и LPMP, модифицированных DC-холестерином, содержащих 433 нг tracrRNA. К клеткам добавляли 50 мкл сверхчистой стерильной воды, которую использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки инкубировали в течение 3 часов при 24°°C в темноте и трижды промывали 1 мл сверхчистой стерильной воды для удаления частиц, которые не были захвачены клетками. Клетки ресуспендировали в 500 мкл сверхчистой стерильной воды для визуализации на эпифлуоресцентном микроскопе (Olympus IX83). По сравнению с отрицательным контролем (сверхчистая стерильная вода), у которого отсутствовала обнаруживаемая флуоресценция, в растительных клетках, обработанных LPMP и LPMP, модифицированными DC-холестерином, можно было обнаружить сигнал флуоресценции различной интенсивности (фиг. 15). Для LPMP, модифицированных DC-холестерином, показан самый сильный сигнал флуоресценции, что указывает на то, что данная модификация PMP обеспечивала наиболее высокую доставку tracrRNA в растительные клетки. Данные авторов настоящего изобретения показывают, что модификация LPMP катионным липидом DC-холестерин улучшала поглощение LPMP из лимона растительными клетками in vitro.

Пример 19. Модификация растения посредством PMP-опосредованной доставки gRNA

В этом примере показана загрузка и функциональная доставка коротких нуклеиновых кислот in planta для воздействия на экспрессию генов. В этом примере дополнительно продемонстрировано, что PMP, загруженные короткими нуклеиновыми кислотами, являются стабильными и сохраняют свою активность внутри растения. В этом примере трансгенное растение dCas9-SunTag-VP64 Arabidopsis thaliana применяли в качестве модельного растения, PMP из грейпфрута применяли в качестве модельного PMP, а направляющие РНК (gRNA), нацеливающиеся на ген FLOWERING WAGENINGEN (FWA), применяли в качестве модельных коротких нуклеиновых кислот (прибл. 35 кДа).

а) *Поглощение восстановленных из липидов PMP интактными растениями*

Авторы настоящего изобретения ранее продемонстрировали, что природные PMP из лимона и грейпфрута могут захватываться интактными корнями растения, включая Arabidopsis thaliana (пример 15). В этом примере авторы настоящего изобретения демонстрируют, что восстановленные из липидов PMP (LPMP) также могут поглощаться корнями растения рода Arabidopsis. Липиды экстрагировали из природных PMP из лимона (LM) и грейпфрута (GF) и восстанавливали как описано в примере 18. LPMP, полученные таким образом, метили липофильным красителем с флуоресценцией в ближней инфракрасной области спектра, 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндотрикарбоцианинйодидом (DiR) (Thermo Fisher). Следует отметить, что 3 мкл исходного раствора DiR (5 мг/мл) добавляли к 1 мг липидов PMP, экстрагированных из грейпфрута и лимона. Высушенную липидную пленку получали, как описано в

примере 18, а затем обрабатывали ультразвуком (ультразвуковая ванна Branson 2800, 10 мин, к. т.) и экструдировали через поликарбонатные фильтры с размером пор 0,8 мкм, 0,4 мкм и 0,2 мкм с использованием мини-экструдера (Avanti® Polar Lipids). Несвязанный краситель удаляли с использованием обессоливающих микроцентрифужных колонок Zeba™ (MWCO 40 кДа, Thermo Fisher Scientific), уравновешенных с помощью воды. DiR-меченные PMP концентрировали на центрифужных фильтрующих блоках Amicon® Ultra-0,5 (порог отсечения по молекулярной массе (MWCO) 100 кДа).

Промытые и простерилизованные фильтрованием препараты DiR-меченных LPMP разбавляли 1:5 с помощью жидкой среды ½ MS (2,15 г/л смеси основных солей Мурасиге-Скуга (Sigma), 10 г/л сахарозы, 0,5 г/л MES (Sigma), pH 5,8, доведенный с помощью KOH) и разделяли на аликвоты по 100 мкл в стерильные 1,5-мл пробирки Eppendorf. Двухнедельные проростки Arabidopsis (Col-0 дикого типа) переносили в подготовленные пробирки Eppendorf с использованием стерильного пинцета. Внимательно следили, чтобы только нижняя треть корня была погружена. Для каждой из обработок (необработанный контроль, контроль с DiR, LM-LPMP-DiR, GF-LPMP-DiR) использовали по пять проростков в отдельных пробирках. Пробирки запечатывали, покрывали алюминиевой фольгой и помещали в инкубатор для выращивания растений на 48 часов. Затем проростки дважды промывали водой, содержащей 1% Triton X-100 (Sigma), и один раз только водой. Проростки сушили на полотенце и помещали в систему визуализации iBright 1500 (Thermo Fisher) для визуализации при 750 нм (длина волны для красителя DiR). У растений, обработанных с помощью LM-LPMP-DiR и GF-LPMP-DiR, наблюдали усиленный сигнал флуоресценции по сравнению с контролями (фиг. 9A и 9B), что указывает на поглощении LPMP растениями.

b) *Модификация и загрузка PMP с помощью gRNA*

Модификация и загрузка PMP, применяемые в данном примере, описаны в примере 18. Природные PMP из лимона применяли в качестве источника липидов, и использовали два разных состава: (1) немодифицированные LPMP и (2) LPMP с добавленным DC-холестерином (DC-Chol-LPMP). Направляющие РНК (gRNA), применяемые в этом примере, получали от Integrated DNA Technologies (IDT). Для получения функционального дуплекса gRNA последовательности Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA XT (23 п. о.), нацеливающиеся на ген FLOWERING WAGENINGEN (FWA) растения рода Arabidopsis (At4g25530), отжигали с универсальной Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA (67 п.о.) в соответствии с инструкциями производителя. Применяли две разные последовательности crRNA: FWA-g4 5'- ACGGAAAGATGTATGGGCTT-3' (SEQ ID NO: 53) и FWA-g17 5'-AAAACTAGGCCATCCATGGA-3' (Papikian et al., Nat Commun, 10: статья № 729, 2019) (SEQ ID NO: 54). Дуплекс gRNA 4 и 17 (SEQ ID NO: 53 и 54) смешивали в эквимолярных количествах и загружали в LPMP, как описано в примере 18. Препараты загруженных LPMP стерилизовали (стерильные фильтры с размером пор 0,2 мкм), промывали с использованием подхода ультрацентрифугирования (100000 g, 30 мин, 4°C) и ресуспендировали в 150 мкл стерильной воды после ультрацентрифугирования.

Концентрацию и медианный размер частиц оценивали посредством NanoFCM и загрузку РНК количественно определяли с использованием набора для анализа РНК Quant-iT™ RiboGreen™ (Thermo Fisher), как описано в примере 18 (таблица 2).

Таблица 2. Концентрация и медианный размер PMP, загруженных gRNA и загруженных tracrRNA

Образец	Количество частиц (частиц/мл)	Средний размер (нм)	SD размера (нм)	Содержание РНК (нг/мкл)
LPMP-gRNA	1,11E+12	88,5	21,4	11,21
DC-Chol-gRNA	1,17E+12	105,0	23,6	487,17
DC-Chol-tracrRNA	1,37E+12	103,7	22,6	379,81

с) Функциональная доставка PMP из лимона, загруженных gRNA, нацеливающейся на FWA, в dCas9-SunTag-VP64 Arabidopsis thaliana

В этом примере авторы настоящего изобретения воспользовались системой dCas9-SunTag-VP64 в трансгенном растении Arabidopsis thaliana (Papikian et al., Nat Commun, 10: статья № 729, 2019). В данной системе, которая состоит из двух модулей, дезактивированная эндонуклеаза Cas9 (dCas9) слита с пептидными повторами GCN4, а транскрипционный активатор VP64 слит с одноцепочечным вариабельным фрагментом антитела к GCN4, что позволяет нескольким копиям VP64 связываться с одним белком dCas9. Путем поставки gRNA, соответствующих промоторной последовательностью представляющего интерес гена (в данном случае FWA), данную систему dCas9-SunTag-VP64 (называемую далее SunTag) можно использовать как ‘устройство дистанционного управления' для активации экспрессии генов. Трансгенные семена растений SunTag Arabidopsis thaliana (Papikian et al., Nat Commun, 10: статья №729, 2019) получали из Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC). Семена стерилизовали следующим образом: 70% этанол в течение 1 мин, 50% бытовой отбеливатель с 0,1% Triton X-100 (Sigma) в течение 10 мин, три раза промывали стерильной деионизированной водой. Стерилизованные семена ресуспендировали в стерильной 0,1% агарозе и подвергали стратификации при 4°C в течение трех дней в темноте. Затем семена помещали на планшеты с ½ MS (2,15 г/л смесь основных солей Мурасиге-Скуга (Sigma), 10 г/л сахарозы, 0,5 г/л MES (Sigma), 5 г/л фитоагара (Duchefa), pH 5,8, доведенный с помощью KOH) с добавлением 35 мг/л гигромицина B (GoldBio) для отбора SunTag-положительных проростков из сегрегирующей популяции T2. Планшеты герметизировали с помощью медицинской ленты (3M) и помещали в инкубатор для выращивания растений при освещение в течение 6 часов для стимуляции прорастания. Затем планшеты покрывали алюминиевой фольгой на 48 часов, раскрывали и проростки выращивали в течение трех дней в обычных условиях для роста (освещение 16 часов, 23°C/21°C день/ночь).

Проростки, устойчивые к гигромицину B, демонстрировали типичный этиолированный фенотип (удлиненный гипокотиль по сравнению с неустойчивыми проростками; неустойчивые проростки погибли). Данный протокол отбора был ранее описан в Harrison et al., Plant Methods, 2: статья № 19, 2006.

Устойчивые проростки (по восемь на обработку, объединенные) собирали из планшетов с помощью стерильного пинцета и помещали в стерильные 2-мл пробирки Eppendorf, содержащие по 200 мкл жидкой среды с ½ MS и 50 мкл LPMP, модифицированных катионными или способными к ионизации липидами, содержащих 19-27 мкг gRNA, и немодифицированных LPMP, содержащих 0,6 мкг gRNA. Обработки были следующими: (1) LPMP-gRNA, (2) DC-Chol-LPMP-gRNA, (3) DC-Chol-LPMP-tracrRNA, и (4) только gRNA (27 мкг). Внимательно следили, чтобы погрузить корни в среду и оставить семядоли плавать на поверхности. Использовали по восемь проростков на одну обработку. Запечатанные пробирки помещали в инкубатор для выращивания растений на 24 или 48 часов, чтобы обеспечить время для захвата PMP корнями растений, для их миграцию по растению и доставки их полезного груза, представляющего собой gRNA, в растительные клетки, а также для включения gRNA в комплекс dCas9-SunTag-VP64 и активации экспрессии гена FWA, который не экспрессируется в проростках (Fujimoto et al., PLoS Genet., 4: e1000048, 2008). После заданного времени инкубации проростки извлекали из PMP-содержащего раствора, промывали один раз в воде UltraPure (Thermo Fisher), сушили на полотенце и замораживали в жидком азоте.

Чтобы определить активацию экспрессии гена FWA, уровни мРНК-транскриптов анализировали с использованием количественной ПЦР с обратной транскрипцией (qRT-PCR). Замороженные проростки размалывали в пробирках с использованием пластиковых пестиков и общую РНК экстрагировали с использованием набора RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. Очищенную РНК элюировали из колонок с применением 40 мкл воды, не содержащей РНКаз (Qiagen). Геномную ДНК удаляли из препаратов РНК с использованием набора с ДНКазой I со степенью чистоты для амплификации (Sigma) в соответствии с инструкциями производителя. Синтез кДНК проводили с применением супер-микса для синтеза первой нити Invitrogen SuperScript™ III (Thermo Fisher) и олиго(dT)праймеров в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы выявить экспрессию гена FWA (At4g25530), проводили количественную ПЦР с применением универсального мастер-микса для qPCR Luna® (NEB) в соответствии с инструкциями производителя на системе для ПЦР в реальном времени Applied Biosystems™ QuantStudio™ 7 Flex (Thermo Fisher). Праймеры, используемые в эксперименте qPCR, были опубликованы ранее (Cabanillas et al., PlantCell, 30: 2594-2615, 2018; Papikian et al., Nat Commun, 10: статья № 729, 2019): FWA_F 5'-TTAGATCCAAAGGAGTATCAAAG-3' (SEQ ID NO; 55), FWA_R 5'-CTTTGGTACCAGCGGAGA-3' (SEQ ID NO: 56), IPP2_F 5'-GTATGAGTTGCTTCTCCAGCAAAG-3' (SEQ ID NO: 57), IPP2_R 5'-GAGGATGGCTGCAACAAGTGT-3' (SEQ ID NO: 58), убиквитин_F 5'-

CCTACCTTTGAGGGGCTTCT-3' (SEQ ID NO: 59), убиквитин_R 5'-GAAGTCGTGAGACAGCGTTG-3' (SEQ ID NO: 60). qPCR проводили с использованием следующей программы: (a) 95°C в течение 60 с; (b) 40 циклов: 95°C в течение 15 с, 60°C в течение 30 с. Ген убиквитина (At2g36060) использовали для нормализации результатов. ATISOPENTENYL DIPHOSPHE ISOMERASE 2 (IPP2) (At3g02780) применяли в качестве внутреннего контроля. Активацию экспрессии гена FWA при разных обработках определяли путем расчета нормализованных значений ΔΔCt (фиг. 10A-10C). Растения, на которые течение 48 часов воздействовали модифицированными DC-холестерином LPMP, загруженными эквимолярным количеством gRNA 4 и 17, продемонстрировали 3-кратное повышение экспрессии гена FWA по сравнению контролем gRNA (фиг. 10B). Контроль DC-Chol LPMP с tracrRNA не индуцировал экспрессию FWA (фиг. 10A и 10B). Значимого отличия в экспрессии IPP2 (ген домашнего хозяйства) между контролями DC-Chol и tracrRNA не обнаружили (фиг. 10C).

Другие варианты осуществления

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения представлены в виде следующих пронумерованных абзацах.

1. Композиция для модификации растений, содержащая совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), где PMP содержат средство, модифицирующее растения.

2. Композиция для модификации растений по пункту 1, где PMP в композиции находятся в концентрации, эффективной для модификации признака растения, где модификация повышает приспособленность растения.

3. Композиция для модификации растений, содержащая совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), где PMP содержат средство, модифицирующее растения, и PMP в композиции находятся в концентрации, эффективной для модификации признака растения, где модификация повышает приспособленность растения.

4. Композиция для модификации растений по пункту 2 или 3, где повышение приспособленности представляет собой ускорение развития, роста, повышение урожайности, устойчивости к абиотическим стрессовым факторам или устойчивости к биотическим стрессовым факторам.

5. Композиция для модификации растений по пункту 2 или 3, где повышение приспособленности растения представляет собой повышение устойчивости к болезням, засуховыносливости, жаровыносливости, холодовыносливости, солевыносливости, выносливости к металлам, выносливости к гербицидам, выносливости к химическим веществам, эффективности использования воды, использования азота, устойчивости к азотному стрессу, фиксации азота, устойчивости к вредителям, устойчивости к травоядным животным, устойчивости к патогенам, урожайности, урожайности в условиях ограниченного количества воды, жизнеспособности, роста, фотосинтетического потенциала, питания, содержания белка, содержания углеводов, содержания масла, биомассы, длины побегов, длины корней, показателя структуры корневой системы, веса семян или количества собираемого урожая.

6. Композиция для модификации растений по пункту 2 или 3, где повышение приспособленности растения представляет собой повышение качества продуктов, собираемых с растения.

7. Композиция для модификации растений по пункту 6, где повышение приспособленности растения представляет собой улучшение вкуса, внешнего вида или срока хранения продукта, собираемого с растения.

8. Композиция для модификации растений по пункту 2 или 3, где повышение приспособленности представляет собой снижение продуцирования аллергена, который стимулирует иммунный ответ у животного.

9. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-8, где средство, модифицирующее растения, является гетерологичной нуклеиновой кислотой.

10. Композиция для модификации растений, содержащая совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), где PMP содержат гетерологичную нуклеиновую кислоту, и PMP в композиции находятся в концентрации, эффективной для повышения приспособленности растения.

11. Композиция для модификации растений по пункту 9 или 10, где гетерологичная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК, РНК, PNA или гибридную молекулу ДНК-РНК.

12. Композиция для модификации растений по пункту 11, где РНК представляет собой матричную РНК (мРНК), направляющую РНК (gRNA) или ингибирующую РНК.

13. Композиция для модификации растений по пункту 12, где ингибирующая РНК представляет собой RNAi, shRNA или miRNA.

14. Композиция для модификации растений по пункту 12 или 13, где ингибирующая РНК подавляет экспрессию гена в растении.

15. Композиция для модификации растений по пункту 9 или 10, где нуклеиновая кислота представляет собой мРНК, модифицированную мРНК или молекулу ДНК, которые повышают экспрессию фермента, порообразующего белка, сигнального лиганда, проникающего в клетку пептида, транскрипционного фактора, рецептора, антитела, нанотела, белка для редактирования генов, рибопротеина, белкового аптамера или шаперона в растении.

16. Композиция для модификации растений по пункту 9 или 10, где нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловую РНК, siRNA, shRNA, miRNA, aiRNA, PNA, морфолиновую нуклеиновую кислоту, LNA, piRNA, рибозим, ДНКзим, аптамер, circRNA, gRNA или молекулу ДНК, которые снижают экспрессию фермента, транскрипционного фактора, секреторного белка, структурного фактора, рибопротеина, белкового аптамера, шаперона, рецептора, сигнального лиганда или транспортера в растении.

17. Композиция для модификации растений по пункту 9 или 10, где гетерологичная нуклеиновая кислота представляет собой конструкцию, которая не интегрируется в геном растения.

18. Композиция для модификации растений по пункту 9 или 10, где гетерологичная

нуклеиновая кислота представляет собой конструкцию, которая интегрируется в геном растения.

19. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-8, где средство, модифицирующее растения, является гетерологичным пептидом.

20. Композиция для модификации растений, содержащая совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), где PMP содержат гетерологичный пептид, и PMP в композиции находятся в концентрации, эффективной для повышения приспособленности растения.

21. Композиция для модификации растений по пункту 19 или 20, где пептид представляет собой фермент, порообразующий белок, сигнальный лиганд, проникающий в клетку пептид, транскрипционный фактор, рецептор, антитело, нанотело, белок для редактирования генов, рибопротеин, белковый аптамер или шаперон.

22. Композиция для модификации растений по пункту 19 или 20, где пептид снижает экспрессию гена в растении.

23. Композиция для модификации растений по пункту 19 или 20, где пептид повышает экспрессию гена в растении.

24. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-23, где PMP содержат два или более различных средств, модифицирующих растения.

25. Композиция для модификации растений по пункту 24, где два или более различных средств, модифицирующих растения, содержат гетерологичную нуклеиновую кислоту и гетерологичный пептид.

26. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-25, где средство, модифицирующее растения, инкапсулировано с помощью PMP.

27. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-25, где средство, модифицирующее растения, встроено в поверхность PMP.

28. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-25, где средство, модифицирующее растения, конъюгировано с поверхностью PMP.

29. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-28, где средство, модифицирующее растения, не является пестицидным.

30. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-29, где композиция является стабильной в течение по меньшей мере одного дня при комнатной температуре и/или стабильной в течение по меньшей мере одной недели при 4°C.

31. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-29, где PMP являются стабильными в течение по меньшей мере 24 часов, 48 часов, семи дней или 30 дней.

32. Композиция для модификации растений по пункту 31, где PMP являются стабильными при температуре, составляющей по меньшей мере 4°C, 20°C, 24°C или 37°C.

33. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-32, где PMP в композиции находятся в концентрации, составляющей по меньшей мере 1, 10, 50, 100 или 250 мкг белка PMP/мл.

34. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-33, где PMP предусматривают очищенную внеклеточную везикулу растения (EV) или ее сегмент или экстракт.

35. Композиция для модификации растений по пункту 34, где EV растения представляет собой модифицированную внеклеточную везикулу растения (EV).

36. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-35, где растение представляет собой сельскохозяйственное или садовое растение.

37. Композиция для модификации растений по пункту 36, где сельскохозяйственное растение представляет собой растение сои, растение пшеницы или растение кукурузы

38. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-37, где композиция составлена для доставки в растению.

39. Композиция для модификации растений по пункту 38, где композиция составлена для доставки в лист, семя, корень, плод, побег или цветок растения.

40. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-39, где композиция содержит носитель, приемлемый с точки зрения сельского хозяйства.

41. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-40, где композиция составлена для стабилизации PMP.

42. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-41, где композиция составлена в виде жидкой, твердой, аэрозольной, пастообразной, гелеобразной или газообразной композиции.

43. Композиция для модификации растений, содержащая совокупность PMP, где PMP получены посредством способа, который предусматривает стадии:

(a) получения исходного образца из растения или его части, где растение или его часть содержат EV;

(b) выделения фракции неочищенных PMP из исходного образца, где фракция неочищенных PMP характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце;

(c) очистки фракции неочищенных PMP, за счет чего получают совокупность чистых PMP, где совокупность чистых PMP характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV;

(d) загрузки совокупности чистых PMP средством, модифицирующим растения; и

(e) составления PMP из стадии (d) для доставки в растение.

44. Растение, содержащее композицию для модификации растений по любому из пунктов 1-43.

45. Способ доставки композиции для модификации растений в растение, предусматривающие приведение растения в контакт с композицией по любому из пунктов 1-43.

46. Способ повышения приспособленности растения, причем способ предусматривает доставку в растение эффективного количества композиции для модификации растений по любому из пунктов 1-43, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения по сравнению с необработанным растением.

47. Способ по пункту 45 или 46, где композицию для модификации растений доставляют в лист, семя, корень, плод, побег, цветок или их часть.

48. Способ повышения приспособленности растения, причем способ предусматривает приведение семени растения в контакт с эффективным количеством композиции для модификации растений по любому из пунктов 1-43, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения по сравнению с необработанным растением.

49. Способ повышения приспособленности растения, причем способ предусматривает приведение меристематической ткани растения в контакт с эффективным количеством композиции для модификации растений по любому из пунктов 1-43, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения по сравнению с необработанным растением.

50. Способ повышения приспособленности растения, причем способ предусматривает приведение зародыша растения в контакт с эффективным количеством композиции для модификации растений по любому из пунктов 1-43, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения по сравнению с необработанным растением.

51. Способ повышения приспособленности растения, причем способ предусматривает приведение протопласта растения в контакт с эффективным количеством композиции для модификации растений по любому из пунктов 1-43, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения по сравнению с необработанным растением.

52. Способ повышения приспособленности растения, причем способ предусматривает приведение растительной клетки в контакт с эффективным количеством композиции для модификации растений по любому из пунктов 1-43, где способ обеспечивает повышение приспособленности растения по сравнению с необработанным растением.

53. Способ по любому из пунктов 46-52, где повышение приспособленности представляет собой ускорение развития, роста, повышение урожайности, устойчивости к абиотическим стрессовым факторам или устойчивости к биотическим стрессовым факторам.

54. Способ по любому из пунктов 46-52, где повышение приспособленности растения представляет собой повышение устойчивости к болезням, засуховыносливости, жаровыносливости, холодовыносливости, солевыносливости, выносливости к металлам, выносливости к гербицидам, выносливости к химическим веществам, эффективности использования воды, использования азота, устойчивости к азотному стрессу, фиксации

азота, устойчивости к вредителям, устойчивости к травоядным животным, устойчивости к патогенам, урожайности, урожайности в условиях ограниченного количества воды, жизнеспособности, роста, фотосинтетического потенциала, питания, содержания белка, содержания углеводов, содержания масла, биомассы, длины побегов, длины корней, показателя структуры корневой системы, веса семян или количества собираемого урожая.

55. Способ по любому из пунктов 46-52, где повышение приспособленности растения представляет собой повышение качества продуктов, собираемых с растения.

56. Способ по пункту 55, где повышение качества представляет собой улучшение вкуса, внешнего вида или срока хранения продукта, собираемого с растения.

57. Способ по любому из пунктов 46-52, где повышение приспособленности представляет собой снижение продуцирования аллергена, который стимулирует иммунный ответ у животного.

58. Способ по любому из пунктов 45-57, где растение представляет собой сельскохозяйственное или садовое растение.

59. Способ по пункту 58, где растение представляет собой растение сои, растение пшеницы или растение кукурузы.

60. Способ по любому из пунктов 45-59, где композицию для модификации растений доставляют в виде жидкости, твердого вещества, аэрозоля, пасты, геля или газообразного вещества.

61. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 1-43, где PMP представляют собой восстановленные из липидов PMP (LPMP).

62. Композиция для модификации растений по пункту 61, где LPMP содержат экзогенный катионный липид.

63. Композиция для модификации растений по пункту 61 или 62, где каждый из модифицированных PMP содержит по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% катионного липида.

64. Композиция для модификации растений по любому из пунктов 61-63, где катионный липид представляет собой DC-холестерин или DOTAP.

65. Способ введения гетерологичной РНК в растение, причем способ предусматривает доставку в растение композиции, содержащей совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), при этом каждый из совокупности содержит гетерологичную РНК, где композицию доставляют в концентрации, эффективной для увеличения приспособленности растения.

66. Способ по пункту 65, где гетерологичная РНК представляет собой направляющую РНК (gRNA).

67. Способ по пункту 66, где gRNA является компонентом рибонуклеопротеинового комплекса (RNP), и где каждый из совокупности PMP содержит RNP.

68. Способ по пункту 65, где PMP представляют собой восстановленные из липидов PMP (LPMP).

69. Способ по пункту 65, где гетерологичная РНК инкапсулирована с помощью PMP.

70. Способ по пункту 65, где каждый из PMP предусматривает очищенную растительную внеклеточную везикулу (EV).

71. Способ по пункту 65, где PMP в композиции находятся в концентрации, эффективной для модификации признака растения, где модификация повышает приспособленность растения.

72. Способ по пункту 65, где повышение приспособленности растения представляет собой ускорение развития, роста, повышение урожайности, устойчивости к абиотическим стрессовым факторам или устойчивости к биотическим стрессовым факторам.

73. Способ по пункту 65, где повышение приспособленности растения представляет собой модификацию времени цветения.

74. Способ по пункту 65, где повышение приспособленности растения представляет собой повышение качества продуктов, собираемых с растения.

75. Способ по пункту 65, где повышение приспособленности растения представляет собой улучшение вкуса, внешнего вида или срока хранения продукта, собираемого с растения.

76. Способ по пункту 65, где повышение приспособленности представляет собой снижение продуцирования аллергена, который стимулирует иммунный ответ у животного.

Несмотря на то, что вышеизложенное изобретение было достаточно подробно описано с помощью иллюстраций и примеров в целях ясности понимания, описания и примеры не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Раскрытия всех источников патентной и научной литературы, цитируемых в данном документе, явным образом включено в их полном объеме посредством ссылки.

Другие варианты осуществления представлены в формуле изобретения.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Маркеры растительных EV		
Иллюстративный вид	**№ доступа**	**Название белка**
Arabidopsis thaliana	C0LGG8	Вероятная LRR-рецептор-подобная серин/треониновая протеинкиназа At1g53430 (EC 2.7.11.1)
Arabidopsis thaliana	F4HQT8	Неохарактеризованный белок
Arabidopsis thaliana	F4HWU0	Белок суперсемейства протеинкиназ
Arabidopsis thaliana	F4I082	Бифункциональный ингибитор/белок-переносчик липидов/запасной белок семян из суперсемейства альбуминов 2S
Arabidopsis thaliana	F4I3M3	Протеинкиназа, содержащая домен тетратрикопептидного повтора
Arabidopsis thaliana	F4IB62	Белок семейства протеинкиназ с богатыми лейцином повторами
Arabidopsis thaliana	O03042	Большая цепь рибулозобифосфаткарбоксилазы (большая субъединица RuBisCO) (EC 4.1.1.39)
Arabidopsis thaliana	O03986	Белок теплового шока 90-4 (AtHSP90.4) (AtHsp90-4) (белок теплового шока 81-4) (Hsp81-4)
Arabidopsis thaliana	O04023	Гомолог белка SRC2 (AtSRC2)
Arabidopsis thaliana	O04309	Родственный джакалину лектин 35 (JA-чувствительный белок 1) (подобный мирозиназа-связывающему белку At3g16470)
Arabidopsis thaliana	O04314	PYK10-связывающий белок 1 (родственный джакалину лектин 30) (белок, индуцируемый жасмоновой кислотой)
Arabidopsis thaliana	O04922	Вероятная глутатионпероксидаза 2 (EC 1.11.1.9)
Arabidopsis thaliana	O22126	Фасциклин-подобный арабиногалактановый белок 8 (AtAGP8)
Arabidopsis thaliana	O23179	Пататин-подобный белок 1 (AtPLP1) (EC 3.1.1.-) (родственная пататину фосфолипаза A II гамма) (pPLAIIg) (фосфолипаза A IVA) (AtPLAIVA)
Arabidopsis thaliana	O23207	Вероятная NAD(P)H дегидрогеназа (хинон) FQR1-

		подобная 2 (EC 1.6.5.2)
Arabidopsis thaliana	O23255	Аденозилгомоцистеиназа 1 (адоНциаза 1) (EC 3.3.1.1) (белок EMBRYO DEFECTIVE 1395) (белок HOMOLOGY-DEPENDENT GENE SILENCING 1) (S-аденозил-L-гомоцистеингидролаза 1) (SAH-гидролаза 1)
Arabidopsis thaliana	O23482	Переносчик олигопептидов 3 (AtOPT3)
Arabidopsis thaliana	O23654	Каталитическая субъединица A протонной АТФазы V-типа (субъединица A V-АТФазы) (EC 3.6.3.14) (субъединица 69 кДа V-АТФазы) (субъединица A вакуольной H(+) АТФазы) (субъединица-альфа вакуольного протонного насоса)
Arabidopsis thaliana	O48788	Вероятная неактивная рецепторная киназа At2g26730
Arabidopsis thaliana	O48963	Фототропин-1 (EC 2.7.11.1) (нефототропный белок 1 гипокотиля) (белок 1 фототропизма корней)
Arabidopsis thaliana	O49195	Запасной белок 1 вегетативных частей
Arabidopsis thaliana	O50008	5-метилтетрагидроптероилтриглутамат-гомоцистеинметилтрансфераза 1 (EC 2.1.1.14) (кобаламин-независимая метионинсинтаза 1) (AtMS1) (витамин-B12-независимая метионинсинтаза 1)
Arabidopsis thaliana	O64696	Предполагаемый неохарактеризованный белок At2g34510
Arabidopsis thaliana	O65572	Каротиноид 9,10 (9',10')-расщепляющая диоксигеназа 1 (EC 1.14.99.n4) (AtCCD1) (фермент, расщепляющий неоксантин NC1) (AtNCED1)
Arabidopsis thaliana	O65660	Белок 1, содержащий домен PLAT (AtPLAT1) (белок 1 с доменом PLAT)
Arabidopsis thaliana	O65719	Белок 3 теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (когнатный белок 3 теплового шока

		70 кДа) (когнатный белок теплового шока 70-3) (AtHsc70-3) (белок теплового шока 70-3) (AtHsp70-3)
Arabidopsis thaliana	O80517	Уклацианин-2 (голубой медь-связывающий белок II) (BCB II) (фитоцианин 2) (уклацианин-II)
Arabidopsis thaliana	O80576	At2g44060 (распространенный белок позднего эмбриогенеза, группа 2) (аналогичный распространенному белку позднего эмбриогенеза)
Arabidopsis thaliana	O80725	Представитель 4 семейства ABC-переносчиков B (ABC-переносчик ABCB.4) (AtABCB4) (белок 4 множественной лекарственной устойчивости) (P-гликопротеин 4)
Arabidopsis thaliana	O80837	Реморин (ДНК-связывающий белок)
Arabidopsis thaliana	O80852	Глутатион-S-трансфераза F9 (AtGSTF9) (EC 2.5.1.18) (AtGSTF7) (представитель 9 GST класса phi)
Arabidopsis thaliana	O80858	Экспрессируемый белок (предполагаемый неохарактеризованный белок At2g30930) (предполагаемый неохарактеризованный белок At2g30930; F7F1.14)
Arabidopsis thaliana	O80939	Рецепторная киназа IV.1, содержащая лектиновый домен L-типа (лектин-рецепторная киназа Arabidopsis thaliana) (AthlecRK-e) (LecRK-IV.1) (EC 2.7.11.1) (лектиновая рецепторная киназа 1)
Arabidopsis thaliana	O80948	Родственный джакалину лектин 23 (подобный мирозиназа-связывающему белку At2g39330)
Arabidopsis thaliana	O82628	Субъединица G1 протонной АТФазы V-типа (субъединица V-АТФазы G1) (изоформа 1 субъединицы G вакуольной H(+) АТФазы) (субъединица G1 вакуольного протонного насоса)
Arabidopsis thaliana	P10795	Малая цепь 1A рибулозобисфосфаткарбоксилазы, хлоропластная (малая субъединица 1A RuBisCO) (EC 4.1.1.39)
Arabidopsis thaliana	P10896	Рибулозобисфосфаткарбоксилаза/активаза

		оксигеназы, хлоропластная (RA) (активаза RuBisCO)
Arabidopsis thaliana	P17094	Рибосомальный белок L3-1 субъединицы 60S (белок EMBRYO DEFECTIVE 2207)
Arabidopsis thaliana	P19456	АТФаза 2 цитоплазматической мембраны (EC 3.6.3.6) (протонный насос 2)
Arabidopsis thaliana	P20649	АТФаза 1 цитоплазматической мембраны (EC 3.6.3.6) (протонный насос 1)
Arabidopsis thaliana	P22953	Вероятный медиатор транскрипционной субъединицы 37e РНК-полимеразы II (белок 1 теплового шока 70 кДа) (когнатный белок 1 теплового шока 70 кДа) (когнатный белок теплового шока 70-1) (AtHsc70-1) (белок теплового шока 70-1) (AtHsp70 -1) (белок EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 2)
Arabidopsis thaliana	P23586	Белок 1 транспорта сахаров (переносчик глюкозы) (переносчик 1 гексоз)
Arabidopsis thaliana	P24636	Цепь бета-4-тубулина (бета-4-тубулин)
Arabidopsis thaliana	P25696	Бифункциональная енолаза 2/транскрипционный активатор (EC 4.2.1.11) (2-фосфо-D-глицератгидролиаза 2) (2-фосфоглицератдегидратаза 2) (LOW EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1)
Arabidopsis thaliana	P25856	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа GAPA1, хлоропластная (EC 1.2.1.13) (субъединица 1 NADP-зависимой глицеральдегидфосфатдегидрогеназы A)
Arabidopsis thaliana	P28186	Ras-родственный белок RABE1c (AtRABE1c) (Ras-родственный белок Ara-3) (Ras-родственный белок Rab8A) (AtRab8A)
Arabidopsis thaliana	P30302	Аквапорин PIP2-3 (интегральный белок 2-3 цитоплазматической мембране) (AtPIP2;3) (интегральный белок 2c цитоплазматической

		мембраны) (PIP2c) (RD28-PIP) (TMP2C) (интегральный белок тонопласта, индуцируемый водным стрессом) (WSI-TIP) [расщепляется на: аквапорин PIP2-3, процессированный на N-конце]
Arabidopsis thaliana	P31414	Пирофосфат-активируемый протонный насос мембраны вакуоли 1 (EC 3.6.1.1) (пирофосфат-активируемая неорганическая пирофосфатаза 1) (H(+)-PPаза 1) (вакуольная протонная пирофосфатаза 1) (вакуольная протонная пирофосфатаза 3)
Arabidopsis thaliana	P32961	Нитрилаза 1 (EC 3.5.5.1)
Arabidopsis thaliana	P38666	Рибосомный белок L24-2 субъединицы 60S (белок SHORT VALVE 1)
Arabidopsis thaliana	P39207	Нуклеозиддифосфаткиназа 1 (EC 2.7.4.6) (нуклеозиддифосфаткиназа I) (NDK I) (NDP киназа I) (NDPK I)
Arabidopsis thaliana	P42643	14-3-3-подобный белок GF14 chi (общий регуляторный фактор 1)
Arabidopsis thaliana	P42737	Бета-карбоангидраза 2, хлоропластная (AtbCA2) (AtbetaCA2) (EC 4.2.1.1) (бета-карбонатдегидратаза 2)
Arabidopsis thaliana	P42759	Дегидрин ERD10 (белок, индуцируемый низкой температурой, LTI45)
Arabidopsis thaliana	P42761	Глутатион S-трансфераза F10 (AtGSTF10) (EC 2.5.1.18) (AtGSTF4) (представитель 10 GST класса phi) (белок EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION 13)
Arabidopsis thaliana	P42763	Дегидрин ERD14
Arabidopsis thaliana	P42791	Рибосомный белок L18-2 субъединицы 60S
Arabidopsis thaliana	P43286	Аквапорин PIP2-1 (интегральный белок 2-1 цитоплазматической мембраны) (AtPIP2; 1) (интегральный белок 2a цитоплазматической мембраны) (PIP2a) [расщепляется на: аквапорин PIP2-1, процессированный на N-конце]

Arabidopsis thaliana	P46286	Рибосомный белок L8-1 субъединицы 60s (60S рибосомный белок L2) (белок EMBRYO DEFECTIVE 2296)
Arabidopsis thaliana	P46422	Глутатион S-трансфераза F2 (AtGSTF2) (EC 2.5.1.18) (ауксин-связывающий белок с молекулярной массой 24 кДа) (AtPM24) (представитель 2 GST класса phi)
Arabidopsis thaliana	P47998	Цистеинсинтаза 1 (EC 2.5.1.47) (At.OAS.5-8) (бета-замещенная Ala-синтаза 1;1) (ARAth-Bsas1;1) (CSаза A) (AtCS-A) (Cys-3A) (O-ацетилсерин (тиол)-лиаза 1) (OAS-TL A) (O-ацетилсеринсульфгидрилаза) (белок ONSET OF LEAF DEATH 3)
Arabidopsis thaliana	P48347	14-3-3-подобный белок GF14 эпсилон (общий регуляторный фактор 10)
Arabidopsis thaliana	P48491	Триозофосфатизомераза, цитозольная (TIM) (триозофосфатизомераза) (EC 5.3.1.1)
Arabidopsis thaliana	P50318	Фосфоглицераткиназа 2, хлоропластная (EC 2.7.2.3)
Arabidopsis thaliana	P53492	Актин-7 (актин-2)
Arabidopsis thaliana	P54144	Представитель 1 переносчиков 1 аммония (AtAMT1;1)
Arabidopsis thaliana	P92963	Ras-родственный белок RABB1c (AtRABB1c) (Ras-родственный белок Rab2A) (AtRab2A)
Arabidopsis thaliana	P93004	Аквапорин PIP2-7 (интегральный белок 2-7 цитоплазматической мембраны) (AtPIP2; 7) (интегральный белок 3 цитоплазматической мембраны) (основной интегральный белок, индуцируемый солевым стрессом) [расщепляется на: аквапорин PIP2-7, процессированный на N-конце]
Arabidopsis thaliana	P93025	Фототропин-2 (EC 2.7.11.1) (дефектный в белке 1 избегания хлоропластов) (белок 1, подобный нефототропному белку-1-гипокотиля) (AtKin7)

		(NPH1-подобный белок 1)
Arabidopsis thaliana	P93819	Малатдегидрогеназа 1, цитоплазматическая (EC 1.1.1.37) (цитозольная NAD-зависимая малатдегидрогеназа 1) (cNAD-MDH1) (цитозольная малатдегидрогеназа 1) (цитозольная MDH1)
Arabidopsis thaliana	Q03250	Богатый глицином РНК-связывающий белок 7 (AtGR-RBP7) (AtRBG7) (богатый глицином белок 7) (AtGRP7) (белок COLD, CIRCADIAN RHYTHM, AND RNA BINDING 2) (белок CCR2)
Arabidopsis thaliana	Q05431	L-аскорбатпероксидаза 1, цитозольная (AP) (AtAPx01) (EC 1.11.1.11)
Arabidopsis thaliana	Q06611	Аквапорин PIP1-2 (AtPIP1; 2) (интегральный белок 1b цитоплазматической мембраны) (PIP1b) (трансмембранный белок A) (AthH2) (TMP-A)
Arabidopsis thaliana	Q07488	Голубой медьсодержащий белок (голубой медь-связывающий белок) (AtBCB) (фитоцианин 1) (стеллацианин)
Arabidopsis thaliana	Q0WLB5	Тяжелая цепь 2 клатрина
Arabidopsis thaliana	Q0WNJ6	Тяжелая цепь 1 клатрина
Arabidopsis thaliana	Q1ECE0	Ассоциированный с везикулами белок 4-1 (растительный гомолог VAP 4-1) (AtPVA41) (белок MEMBRANE-ASSOCIATED MANNITOL-INDUCED) (AtMAMI) (VAMP-ассоциированный белок 4-1)
Arabidopsis thaliana	Q38882	Фосфолипаза D альфа 1 (AtPLDalpha1) (PLD альфа 1) (EC 3.1.4.4) (холинфосфатаза 1) (PLD-альфа) (фосфатидилхолин-гидролизующая фосфолипаза D 1)
Arabidopsis thaliana	Q38900	Пептидилпролил-цис-транс-изомераза CYP19-1 (PPIаза CYP19-1) (EC 5.2.1.8) (циклофилин 19 кДа-1) (ротамаза-циклофилин-3)
Arabidopsis thaliana	Q39033	Фосфоинозитидфосфолипаза C 2 (EC 3.1.4.11) (фосфоинозитидфосфолипаза PLC2) (AtPLC2) (PI-

		PLC2)
Arabidopsis thaliana	Q39085	Дельта(24)-стеролредуктаза (EC 1.3.1.72) (белок удлинения клетки DIMINUTO) (белок удлинения клетки Dwarf1) (белок CABBAGE1) (белок ENHANCED VERY-LOW-FLUENCE RESPONSE 1)
Arabidopsis thaliana	Q39228	Белок 4 транспорта сахаров (переносчик 4 гексоз)
Arabidopsis thaliana	Q39241	Тиоредоксин H5 (AtTrxh5) (белок LOCUS OF INSENSITIVITY TO VICTORIN 1) (тиоредоксин 5) (AtTRX5)
Arabidopsis thaliana	Q39258	Субъединица E1 протонной АТФазы V-типа (субъединица E1 V-АТФазы) (белок EMBRYO DEFECTIVE 2448) (изоформа 1 субъединицы E вакуольной H(+)-АТФазы) (субъединица E1 вакуольного протонного насоса)
Arabidopsis thaliana	Q42112	Кислый рибосомный белок P0-2 субъединицы 60S
Arabidopsis thaliana	Q42403	Тиоредоксин H3 (AtTrxh3) (тиоредоксин 3) (AtTRX3)
Arabidopsis thaliana	Q42479	Кальций-зависимая протеинкиназа 3 (EC 2.7.11.1) (изоформа CDPK6 кальций-зависимой протеинкиназы) (AtCDPK6)
Arabidopsis thaliana	Q42547	Каталаза-3 (EC 1.11.1.6)
Arabidopsis thaliana	Q56WH1	Цепь альфа-3 тубулина
Arabidopsis thaliana	Q56WK6	Пателлин-1
Arabidopsis thaliana	Q56X75	CASP-подобный белок 4D2 (AtCASPL4D2)
Arabidopsis thaliana	Q56ZI2	Пателлин-2
Arabidopsis thaliana	Q7Y208	Глицерофосфодиэфирфосфодиэстераза GDPDL1 (EC 3.1.4.46) (белок 1, подобный глицерофосфодиэфирфосфодиэстеразе) (ATGDPDL1) (белок 3, подобный глицерофосфодиэстеразе) (белок SHV3-LIKE 2)
Arabidopsis thaliana	Q84VZ5	Неохарактеризованный GPI-заякоренный белок At5g19240
Arabidopsis thaliana	Q84WU7	Белок семейства аспартилпротеаз эукариот

		(предположительный неохарактеризованный белок At3g51330)
Arabidopsis thaliana	Q8GUL8	Неохарактеризованный GPI-заякоренный белок At5g19230
Arabidopsis thaliana	Q8GYA4	Богатая цистеином рецептор-подобная протеинкиназа 10 (богатая цистеином RLK10) (EC 2.7.11.-) (рецептор-подобная протеинкиназа 4)
Arabidopsis thaliana	Q8GYN5	RPM1-взаимодействующий белок 4
Arabidopsis thaliana	Q8GZ99	At5g49760 (белок семейства протеинкиназ с богатыми лейцином повторами) (протеинкиназа, подобная рецептору с богатыми лейцином повторами) (предположительная рецепторная протеинкиназа)
Arabidopsis thaliana	Q8L636	Антипортер натрия/кальция NCL (Na(+)/Ca(2+)-обменный белок NCL) (NCX-подобный белок) (AtNCL)
Arabidopsis thaliana	Q8L7S1	At1g45200 (At1g45200/At1g45200) (белок 1, подобный триацилглицеринлипазе)
Arabidopsis thaliana	Q8LAA6	Вероятный аквапорин PIP1-5 (AtPIP1; 5) (интегральный белок 1d цитоплазматической мембраны) (PIP1d)
Arabidopsis thaliana	Q8LCP6	Эндоглюканаза 10 (EC 3.2.1.4) (эндо-1,4-бета-глюканаза 10)
Arabidopsis thaliana	Q8RWV0	Транскетолаза-1, хлоропластная (TK) (EC 2.2.1.1)
Arabidopsis thaliana	Q8S8Q6	Тетраспанин-8
Arabidopsis thaliana	Q8VZG8	MDIS1-взаимодействующая рецептор-подобная киназа 2 (AtMIK2) (вероятная LRR рецептор-подобная серин/треонин-протеинкиназа At4g08850) (EC 2.7.11.1)
Arabidopsis thaliana	Q8VZU2	Синтаксин-132 (AtSYP132)
Arabidopsis thaliana	Q8W4E2	Субъединица B3 протонной АТФазы V-типа (субъединица B3 V-АТФазы) (изоформа 3 субъединицы B вакуольной H(+) АТФазы) (субъединица B3 вакуольного протонного насоса)

Arabidopsis thaliana	Q8W4S4	Субъединица a3 протонной АТФазы V-типа (субъединица a3 V-АТФазы) (изоформа 3 95 кДа-субъединицы a протонной АТФаза V-типа) (изоформа a3 95 кДа V-АТФазы) (изоформа 3 субъединицы a вакуольной H(+)-АТФазы) (субъединица a3 вакуольного протонного насоса) (изоформа 3 95 кДа-субъединицы a вакуольной протон-транслоцирующей АТФазы)
Arabidopsis thaliana	Q93VG5	Рибосомный белок S8-1 субъединицы 40S
Arabidopsis thaliana	Q93XY5	Тетраспанин-18 (гомологичный белок 2 TOM2A)
Arabidopsis thaliana	Q93YS4	Представитель 22 семейства ABC-переносчиков G (ABC-переносчик ABCG.22) (AtABCG22) (гомолог белка 23 бело-коричневого комплекса) (AtWBC23)
Arabidopsis thaliana	Q93Z08	Глюкан-эндо-1,3-бета-глюкозидаза 6 (EC 3.2.1.39) ((1->3)-бета-глюканэндогидролаза 6) ((1->3)-бета-глюканаза 6) (бета-1,3 -эндоглюканаза 6) (бета-1,3-глюканаза 6)
Arabidopsis thaliana	Q940M8	3-оксо-5-альфа-стероид-4-дегидрогеназа (DUF1295) (At1g73650/F25P22_7)
Arabidopsis thaliana	Q944A7	Вероятная серин/треониновая протеинкиназа At4g35230 (EC 2.7.11.1)
Arabidopsis thaliana	Q944G5	Белок NRT1/семейства белков 2.10 (AtNPF2.10) (белок GLUCOSINOLATE TRANSPORTER-1)
Arabidopsis thaliana	Q94AZ2	Белок 13 транспорта сахаров (переносчик 13 гексоз) (белок 1 дефицита многокопийного супрессора snf4)
Arabidopsis thaliana	Q94BT2	Белок 12, индуцируемый ауксином в культурах корней
Arabidopsis thaliana	Q94CE4	Бета-карбоангидраза 4 (AtbCA4) (AtbetaCA4) (EC 4.2.1.1) (бета-карбонатдегидратаза 4)
Arabidopsis thaliana	Q94KI8	Белок 1 двухпорового кальциевого канала (белок 1 кальциевого канала) (AtCCH1) (белок 2, экспрессия которого повышается при окислении

		жирных кислот) (белок TPC1 кальциевого канала, зависимого от напряжения) (AtTPC1)
Arabidopsis thaliana	Q96262	Катион-связывающий белок 1, ассоциированный с цитоплазматической мембраной (AtPCAP1) (белок 25, дестабилизирующий микротрубочки)
Arabidopsis thaliana	Q9C5Y0	Фосфолипаза D дельта (AtPLDdelta) (дельта PLD) (EC 3.1.4.4)
Arabidopsis thaliana	Q9C7F7	Белок 1 неспецифических белков-переносчиков липидов GPI-заякоренных (AtLTPG-1) (белок LTP-GPI-ANCHORED 1)
Arabidopsis thaliana	Q9C821	Богатая пролином рецептор-подобная протеинкиназа PERK15 (EC 2.7.11.1) (богатая пролином экстенсин-подобная рецепторная киназа 15) (AtPERK15)
Arabidopsis thaliana	Q9C8G5	CSC1-подобный белок ERD4 (белок EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION STRESS 4)
Arabidopsis thaliana	Q9C9C5	Рибосомный белок L6-3 субъединицы 60S
Arabidopsis thaliana	Q9CAR7	Белок 2 ответа, индуцируемого гиперчувствительностью (AtHIR2)
Arabidopsis thaliana	Q9FFH6	Фасциклин-подобный арабиногалактановый белок 13
Arabidopsis thaliana	Q9FGT8	Индуцируемый температурой липокалин-1 (AtTIL1)
Arabidopsis thaliana	Q9FJ62	Глицерофосфодиэфирфосфодиэстераза GDPDL4 (EC 3.1.4.46) (белок 4, подобный глицерофосфодиэфирфосфодиэстеразе) (ATGDPDL4) (белок 1, подобный глицерофосфодиэстеразе) (белок SHV3-LIKE 1)
Arabidopsis thaliana	Q9FK68	Ras-родственный белок RABA1c (AtRABA1c)
Arabidopsis thaliana	Q9FKS8	Лизин-гистидиновый переносчик 1
Arabidopsis thaliana	Q9FM65	Фасциклин-подобный арабиногалактановый белок 1
Arabidopsis thaliana	Q9FNH6	NDR1/HIN1-подобный белок 3
Arabidopsis thaliana	Q9FRL3	ERD6-подобный переносчик сахаров 6

Arabidopsis thaliana	Q9FWR4	Глутатион S-трансфераза DHAR1, митохондриальная (EC 2.5.1.18) (гомолог 1 внутриклеточного канала хлорида) (гомолог CLIC 1) (глутатион-зависимая дегидроаскорбатредуктаза 1) (AtDHAR1) (GSH-зависимая дегидроаскорбатредуктаза 1) (mtDHAR)
Arabidopsis thaliana	Q9FX54	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа GAPC2, цитозольная (EC 1.2.1.12) (субъединица 2 NAD-зависимой глицеральдегидфосфатдегидрогеназы A)
Arabidopsis thaliana	Q9LE22	Вероятный кальций-связывающий белок CML27 (кальмодулин-подобный белок 27)
Arabidopsis thaliana	Q9LEX1	At3g61050 (белок CaLB) (белок семейства кальций-зависимых липид-связывающих белков (домен CaLB))
Arabidopsis thaliana	Q9LF79	Кальций-транспортирующая АТФаза 8 цитоплазматической мембраны (EC 3.6.3.8) (изоформа 8 Ca(2+)-АТФазы)
Arabidopsis thaliana	Q9LJG3	GDSL-эстераза/липаза ESM1 (EC 3.1.1.-) (внеклеточная липаза ESM1) (белок EPITHIOSPECIFIER MODIFIER 1) (AtESM1)
Arabidopsis thaliana	Q9LJI5	Субъединица d1 протонной АТФазы V-типа (субъединица d1 V-АТФазы) (изоформа 1 субъединицы d вакуольной H(+) АТФазы) (субъединица d1 вакуольного протонного насоса)
Arabidopsis thaliana	Q9LME4	Вероятная протеинфосфатаза 2C 9 (AtPP2C09) (EC 3.1.3.16) (фитохром-ассоциированная протеинфосфатаза 2C) (PAPP2C)
Arabidopsis thaliana	Q9LNP3	At1g17620/F11A6_23 (F1L3.32) (семейство богатых гидроксипролином распространенных гликопротеинов позднего эмбриогенеза (LEA)) (предположительный неохарактеризованный белок At1g17620)
Arabidopsis thaliana	Q9LNW1	Ras-родственный белок RABA2b (AtRABA2b)

Arabidopsis thaliana	Q9LQU2	Белок PLANT CADMIUM RESISTANCE 1 (AtPCR1)
Arabidopsis thaliana	Q9LQU4	Белок PLANT CADMIUM RESISTANCE 2 (AtPCR2)
Arabidopsis thaliana	Q9LR30	Глутамат-глиоксилатаминотрансфераза 1 (AtGGT2) (EC 2.6.1.4) (аланинаминотрансфераза GGT1) (EC 2.6.1.2) (аланинглиоксилатаминотрансфераза GGT1) (EC 2.6.1.44) (аланин-2-оксоглутаратаминотрансфераза 1) (EC 2.6.1.-)
Arabidopsis thaliana	Q9LSI9	Инактивированная LRR рецептор-подобная серин/треониновая протеинкиназа BIR2 (белок BAK1-INTERACTING RECEPTOR-LIKE KINASE 2)
Arabidopsis thaliana	Q9LSQ5	NAD(P)H дегидрогеназа (хинон) FQR1 (EC 1.6.5.2) (флаводоксин-подобная хинонредуктаза 1)
Arabidopsis thaliana	Q9LUT0	Белок суперсемейства протеинкиназ (предположительный неохарактеризованный белок At3g17410) (белок, подобный серин/треониновой киназе)
Arabidopsis thaliana	Q9LV48	Богатая пролином рецептор-подобная протеинкиназа PERK1 (EC 2.7.11.1) (богатая пролином экстенсин-подобная рецепторная киназа 1) (AtPERK1)
Arabidopsis thaliana	Q9LX65	Субъединица H протонной АТФазы V-типа (субъединица H V-АТФазы) (субъединица H вакуольной H(+)-АТФазы) (субъединица H вакуольного протонного насоса)
Arabidopsis thaliana	Q9LYG3	NADP-зависимая малатдегидрогеназа 2 (AtNADP-ME2) (NADP-малатдегидрогеназа 2) (EC 1.1.1.40)
Arabidopsis thaliana	Q9M088	Глюкан-эндо-1,3-бета-глюкозидаза 5 (EC 3.2.1.39) ((1->3)-бета-глюкан-эндогидролаза 5) ((1->3)-бета-глюканаза 5) (бета-1,3 -эндоглюканаза 5) (бета-1,3-глюканаза 5)

Arabidopsis thaliana	Q9M2D8	Неохарактеризованный белок At3g61260
Arabidopsis thaliana	Q9M386	Семейство богатых гидроксипролином распространенных гликопротеинов позднего эмбриогенеза (LEA) (предположительный неохарактеризованный белок At3g54200) (предположительный неохарактеризованный белок F24B22.160)
Arabidopsis thaliana	Q9M390	Белок NRT1/семейство белков 8.1 (AtNPF8.1) (переносчик пептидов PTR1)
Arabidopsis thaliana	Q9M5P2	Мембранный белок 3, ассоциированный с секреторным носителем (AtSC3) (секреторный мембранный белок-носитель 3)
Arabidopsis thaliana	Q9M8T0	Вероятная инактивированная рецепторная киназа At3g02880
Arabidopsis thaliana	Q9SDS7	Субъединица C протонной АТФазы V-типа (субъединица C V-АТФазы) (субъединица C вакуольной H(+)-АТФазы) (субъединица C вакуольного протонного насоса)
Arabidopsis thaliana	Q9SEL6	Белок 11 везикулярного транспорта v-SNARE(AtVTI11) (белок SHOOT GRAVITROPISM 4) (белок-рецептор VTI1a везикул для прикрепления растворимого NSF) (AtVTI1a) (белок VTI1a везикулярного транспорта v-SNARE)
Arabidopsis thaliana	Q9SF29	Синтаксин-71 (AtSYP71)
Arabidopsis thaliana	Q9SF85	Аденозинкиназа 1 (АК 1) (EC 2.7.1.20) (аденозин-5'-фосфотрансфераза 1)
Arabidopsis thaliana	Q9SIE7	Белок 2, содержащий домен PLAT (AtPLAT2) (белок 2 с доменом PLAT)
Arabidopsis thaliana	Q9SIM4	Рибосомный белок L14-1 субъединицы 60S
Arabidopsis thaliana	Q9SIU8	Вероятная протеинфосфатаза 2C 20 (AtPP2C20) (EC 3.1.3.16) (AtPPC3; 1.2)
Arabidopsis thaliana	Q9SJ81	Фасциклин-подобный арабиногалактановый белок 7

Arabidopsis thaliana	Q9SKB2	Рецептор-подобная серин/треонин/тирозиновая протеинкиназа с богатыми лейцином повторами SOBIR1 (EC 2.7.10.1) (EC 2.7.11.1) (белок EVERSHED) (белок-SUPPRESSOR OF BIR1-1)
Arabidopsis thaliana	Q9SKR2	Синаптотагмин-1 (NTMC2T1.1) (синаптотагмин A)
Arabidopsis thaliana	Q9SLF7	Кислый рибосомный белок P2-2 субъединицы 60S
Arabidopsis thaliana	Q9SPE6	Белок альфа-2 прикрепления растворимого NSF (альфа-SNAP2) (белок альфа 2 прикрепления фактора, чувствительного к N-этилмалеимиду)
Arabidopsis thaliana	Q9SRH6	Белок 3, индуцируемый гиперчувствительностью (AtHIR3)
Arabidopsis thaliana	Q9SRY5	Глутатион-S-трансфераза F7 (EC 2.5.1.18) (AtGSTF8) (представитель 7 GST класса phi) (глутатион-S-трансфераза 11)
Arabidopsis thaliana	Q9SRZ6	Цитозольная изоцитратдегидрогеназа [NADP] (EC 1.1.1.42)
Arabidopsis thaliana	Q9SSK5	MLP-подобный белок 43
Arabidopsis thaliana	Q9SU13	Фасциклин-подобный арабиногалактановый белок 2
Arabidopsis thaliana	Q9SU40	Белок, подобный оксидазе с одним атомом меди SKU5 (сморщенные корни)
Arabidopsis thaliana	Q9SUR6	Цистинлиаза CORI3 (EC 4.4.1.35) (белок CORONATINE INDUCED 3) (белок JASMONIC ACID RESPONSIVE 2) (тирозинаминотрансфераза CORI3)
Arabidopsis thaliana	Q9SVC2	Синтаксин-122 (AtSYP122) (Synt4)
Arabidopsis thaliana	Q9SVF0	Предположительный неохарактеризованный белок AT4g38350 (предположительный нехарактеризованный белок F22I13.120)
Arabidopsis thaliana	Q9SW40	Белок суперсемейства мембранных транспортеров (предположительный неохарактеризованный белок AT4g34950) (предположительный неохарактеризованный белок T11I11.190)

Arabidopsis thaliana	Q9SYT0	Аннексин D1 (AnnAt1) (аннексин A1)
Arabidopsis thaliana	Q9SZ11	Глицерофосфодиэфирфосфодиэстераза GDPDL3 (EC 3.1.4.46) (белок 3, подобный глицерофосфодиэфирфосфодиэстеразы) (ATGDPDL3) (белок 2, подобный глицерофосфодиэстеразы) (белок MUTANT ROOT HAIR 5) (белок SHAVEN 3)
Arabidopsis thaliana	Q9SZN1	Субъединица B2 протонной АТФазы V-типа (субъединица V-АТФазы B2) (изоформа 2 субъединицы B вакуольной H(+) АТФазы) (субъединица B2 вакуольного протонного насоса)
Arabidopsis thaliana	Q9SZP6	AT4g38690/F20M13_250 (белок суперсемейства PLC-подобных фосфодиэстераз) (предположительный неохарактеризованный белок AT4g38690) (предположительный неохарактеризованный белок F20M13.250)
Arabidopsis thaliana	Q9SZR1	Кальций-транспортирующая АТФаза 10 цитоплазматической мембраны (EC 3.6.3.8) (изоформа 10 Ca(2+) АТФазы)
Arabidopsis thaliana	Q9T053	Фосфолипаза D гамма 1 (AtPLD-гамма1) (PLD гамма 1) (EC 3.1.4.4) (холинфосфатаза) (лецитиназа D) (липофосфодиэстераза II)
Arabidopsis thaliana	Q9T076	Ранний нодулин-подобный белок 2 (фитоцианин-подобный белок)
Arabidopsis thaliana	Q9T0A0	Синтетаза 4 длинноцепочечных ацил-КоА (EC 6.2.1.3)
Arabidopsis thaliana	Q9T0G4	Предположительный неохарактеризованный белок AT4g10060 (предположительный нехарактеризованный белок T5L19.190)
Arabidopsis thaliana	Q9XEE2	Аннексин D2 (AnnAt2)
Arabidopsis thaliana	Q9XGM1	Субъединица D протонной АТФазы V-типа (субъединица D V-АТФазы) (субъединица D вакуольной H(+) АТФазы) (субъединица D вакуольного протонного насоса)

Arabidopsis thaliana	Q9XI93	At1g13930/F16A14.27 (F16A14.14) (белок F7A19.2) (олеозин-B3-подобный белок)
Arabidopsis thaliana	Q9XIE2	Представитель 36 семейства ABC-переносчиков G (ABC-переносчик ABCG.36) (AtABCG36) (белок 8 плейотропной резистентности к лекарственным средствам) (белок PENETRATION 3)
Arabidopsis thaliana	Q9ZPZ4	Предположительный неохарактеризованный белок (предположительный неохарактеризованный белок At1g09310) (белок T31J12.3)
Arabidopsis thaliana	Q9ZQX4	Субъединица F протонной АТФазы V-типа (субъединица F V-АТФазы) (субъединица V-АТФазы 14 кДа) (субъединица F вакуольной H(+) АТФазы) (субъединица F вакуольного протонного насоса)
Arabidopsis thaliana	Q9ZSA2	Кальций-зависимая протеинкиназа 21 (EC 2.7.11.1)
Arabidopsis thaliana	Q9ZSD4	Синтаксин-121 (AtSYP121) (белок, родственный синтаксину At-Syr1)
Arabidopsis thaliana	Q9ZV07	Вероятный аквапорин PIP2-6 (интегральный белок 2-6 цитоплазматической мембраны) (AtPIP2; 6) (интегральный белок 2e цитоплазматической мембраны) (PIP2e) [расщепляется на: вероятный аквапорин PIP2-6, процессированный на N-конце]
Arabidopsis thaliana	Q9ZVF3	MLP-подобный белок 328
Arabidopsis thaliana	Q9ZWA8	Фасциклин-подобный арабиногалактановый белок 9
Arabidopsis thaliana	Q9ZSD4	SYR1, белок 1, связанный с синтаксином, также известный как SYP121, PENETRATION1/PEN1 (белок PENETRATION 1)
Citrus lemon	A1ECK0	Предположительный глутаредоксин
Citrus lemon	A9YVC9	Субъединица-бета пирофосфат-фруктозо-6-фосфат-1-фосфатрансферазы (PFP) (EC 2.7.1.90) (6-фосфофруктокиназа, пирофосфат-зависимая) (PPi-PFK) (пирофосфат-зависимая 6-

		фосфофруктозо-1-киназа)
Citrus lemon	B2YGY1	Гликозилтрансфераза (EC 2.4.1.-)
Citrus lemon	B6DZD3	Глутатион S-трансфераза Tau2 (глутатионтрансфераза Tau2)
Citrus lemon	C3VIC2	Фактор элонгации трансляции
Citrus lemon	C8CPS0	Субъединица-альфа импортина
Citrus lemon	D3JWB5	Флаванон-3-гидроксилаза
Citrus lemon	E0ADY2	Предположительная O-метилтрансфераза кофейной кислоты
Citrus lemon	E5DK62	Субъединица-альфа АТФ-синтазы (фрагмент)
Citrus lemon	E9M5S3	Предположительная L-галактозо-1-фосфатфосфатаза
Citrus lemon	F1CGQ9	Белок теплового шока 90
Citrus lemon	F8WL79	Аминопептидаза (EC 3.4.11.-)
Citrus lemon	F8WL86	Белок теплового шока
Citrus lemon	K9JG59	Белок, родственный ABSCISIC ACID STRESS RIPENING
Citrus lemon	Q000W4	Fe (III)-хелатредуктаза
Citrus lemon	Q39538	Белок теплового шока (фрагмент)
Citrus lemon	Q5UEN6	Предположительный белок сигнал-распознающей частицы
Citrus lemon	Q8GV08	Дегидрин
Citrus lemon	Q8L893	Цитозольная фосфоглюкомутаза (фрагмент)
Citrus lemon	Q8S990	Белок, ингибирующий полигалактуроназу
Citrus lemon	Q8W3U6	Белок-ингибитор полигалактуроназы
Citrus lemon	Q93XL8	Дегидрин COR15
Citrus lemon	Q941Q1	Несимбиотический гемоглобин класса 1
Citrus lemon	Q9MBF3	РНК-связывающий белок, богатый глицином
Citrus lemon	Q9SP55	Субъединица G протонной АТФазы V-типа (субъединица G V-АТФазы) (субъединица G вакуольного протонного насоса)
Citrus lemon	Q9THJ8	Большая цепь рибулозобисфосфаткарбоксилазы (EC 4.1.1.39) (фрагмент)
Citrus lemon	Q9ZST2	Субъединица-альфа пирофосфат-фруктозо-6-

		фосфат-1-фосфатрансферазы (PFP) (6-фосфофруктокиназа, пирофосфат-зависимая) (PPi-PFK) (пирофосфат-зависимая 6-фосфофруктозо-1-киназа)
Citrus lemon	Q9ZWH6	Ингибитор полигалактуроназы
Citrus lemon	S5DXI9	Нуклеокапсидный белок
Citrus lemon	S5NFC6	GTP-циклогидролаза
Citrus lemon	V4RG42	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RGP4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RHN8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RJ07	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RJK9	Аденозилгомоцистеиназа (EC 3.3.1.1)
Citrus lemon	V4RJM1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RJX1	Рибосомный белок S6 субъединицы 40S
Citrus lemon	V4RLB2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RMX8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RNA5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RP81	Гликозилтрансфераза (EC 2.4.1.-)
Citrus lemon	V4RPZ5	Белок, ассоциированный с аденилилциклазой
Citrus lemon	V4RTN9	Гистон H4
Citrus lemon	V4RUZ4	Фосфосеринаминотрансфераза (EC 2.6.1.52)
Citrus lemon	V4RVF6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RXD4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RXG2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RYA0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RYE3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RYH3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RYX8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RZ12	Субъединица бета' коатомера
Citrus lemon	V4RZ89	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RZE3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RZF3	1,2-дигидрокси-3-кето-5-метилтиопентендиоксигеназа (EC 1.13.11.54) (ациредуктон-диоксигеназа (Fe(2+)-зависимая))

		(ARD) (Fe-ARD)
Citrus lemon	V4RZM7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4RZX6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S1V0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S2B6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S2N1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S2S5	Неохарактеризованный белок (фрагмент)
Citrus lemon	V4S346	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S3T8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S409	Цианатгидратаза (цианаза) (EC 4.2.1.104) (цианатгидролаза) (цианатлиаза)
Citrus lemon	V4S4E4	Гистон H2B
Citrus lemon	V4S4F6	Флавинсодержащая монооксигеназа (EC 1.-.-.-)
Citrus lemon	V4S4J1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S4K9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S535	Субъединица протеасомы альфа-типа (EC 3.4.25.1)
Citrus lemon	V4S5A8	Изоцитратдегидрогеназа [NADP] (EC 1.1.1.42)
Citrus lemon	V4S5G8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S5I6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S5N4	Неохарактеризованный белок (фрагмент)
Citrus lemon	V4S5Q3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S5X8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S5Y1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S6P4	Кальций-транспортирующая АТФаза (EC 3.6.3.8)
Citrus lemon	V4S6W0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S6W7	Неохарактеризованный белок (фрагмент)
Citrus lemon	V4S6Y4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S773	Рибосомный белок L19
Citrus lemon	V4S7U0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S7U5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S7W4	Пируваткиназа (EC 2.7.1.40)
Citrus lemon	V4S885	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S8T3	Пептидилпролил-цис-транс-изомераза (PPIаза) (EC 5.2.1.8)

Citrus lemon	V4S920	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S999	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4S9G5	Фосфоглицераткиназа (EC 2.7.2.3)
Citrus lemon	V4S9Q6	Бета-амилаза (EC 3.2.1.2)
Citrus lemon	V4SA44	Серин/треониновая протеинфосфатаза (EC 3.1.3.16)
Citrus lemon	V4SAE0	Альфа-1,4-глюканфосфорилаза (EC 2.4.1.1)
Citrus lemon	V4SAF6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SAI9	Субъединица M фактора инициации трансляции 3 эукариот (eIF3m)
Citrus lemon	V4SAJ5	Рибосомный белок
Citrus lemon	V4SAR3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SB37	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SBI0	Фактор элонгации 1-альфа
Citrus lemon	V4SBI8	D-3-фосфоглицератдегидрогеназа (EC 1.1.1.95)
Citrus lemon	V4SBL9	Полиаденилат-связывающий белок (PABP)
Citrus lemon	V4SBR1	S-формилглутатионгидролаза (EC 3.1.2.12)
Citrus lemon	V4SBR6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SCG7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SCJ2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SCQ6	Пептидилпролил-цис-транс-изомераза (PPIaза) (EC 5.2.1.8)
Citrus lemon	V4SDJ8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SE41	Белок DETOXIFICATION (белок множественной резистентности к лекарственным средствам и выведения токсичных соединений)
Citrus lemon	V4SE90	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SED1	Субъединица флавопротеина сукцинатдегидрогеназы [убихинон], митохондриальная (EC 1.3.5.1)
Citrus lemon	V4SEI1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SEN9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SEX8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SF31	Неохарактеризованный белок

Citrus lemon	V4SF69	Рибосомный белок S24 субъединицы 40S
Citrus lemon	V4SF76	Цистеинсинтаза (EC 2.5.1.47)
Citrus lemon	V4SFK3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SFL4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SFW2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SGC9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SGJ4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SGN4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SGV6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SGV7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SHH1	АТФаза цитоплазматической мембраны (EC 3.6.3.6) (фрагмент)
Citrus lemon	V4SHI2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SHJ3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SI86	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SI88	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SIA2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SIC1	Фосфолипаза D (EC 3.1.4.4)
Citrus lemon	V4SJ14	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SJ48	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SJ69	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SJD9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SJS7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SJT5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SKA2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SKG4	Глюкозо-6-фосфатизомераза (EC 5.3.1.9)
Citrus lemon	V4SKJ1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SL90	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SLC6	Субъединица протеасомы бета-типа (EC 3.4.25.1)
Citrus lemon	V4SLI7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SLQ6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SMD8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SMN7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SMV5	Неохарактеризованный белок

Citrus lemon	V4SN00	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SNA9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SNC1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SNC4	Аконитатгидратаза (аконитаза) (EC 4.2.1.3)
Citrus lemon	V4SNZ3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SP86	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SPM1	Рибосомный белок S12 субъединицы 40S
Citrus lemon	V4SPW4	Рибосомный белок S4 субъединицы 40S
Citrus lemon	V4SQ71	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SQ89	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SQ92	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SQC7	Пероксидаза (EC 1.11.1.7)
Citrus lemon	V4SQG3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SR15	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SRN3	Представитель 9 суперсемейства трансмембранных белков
Citrus lemon	V4SS09	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SS11	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SS50	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SSB6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SSB8	Субъединица протеасомы альфа-типа (EC 3.4.25.1)
Citrus lemon	V4SSL7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SSQ1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SST6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SSW9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SSX5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SU82	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SUD3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SUL7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SUP3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SUT4	UDP-глюкозо-6-дегидрогеназа (EC 1.1.1.22)
Citrus lemon	V4SUY5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SV60	Серин/треониновая протеинфосфатаза (EC 3.1.3.16)

Citrus lemon	V4SV61	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SVI5	Субъединица протеасомы альфа-типа (EC 3.4.25.1)
Citrus lemon	V4SVI6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SW04	Неохарактеризованный белок (фрагмент)
Citrus lemon	V4SWD9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SWJ0	Рибосомный белок S3a субъединицы 40S
Citrus lemon	V4SWQ9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SWR9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SWU9	Фруктозобисфосфатальдолаза (EC 4.1.2.13)
Citrus lemon	V4SX11	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SX99	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SXC7	Субъединица протеасомы альфа-типа (EC 3.4.25.1)
Citrus lemon	V4SXQ5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SXW1	Бета-адаптин-подобный белок
Citrus lemon	V4SXY9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SY74	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SY90	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SY93	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SYH9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SYK6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SZ03	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SZ73	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SZI9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4SZX7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T057	Рибосомный белок L15
Citrus lemon	V4T0V5	Субъединица A фактора инициации трансляции 3 эукариот (eIF3a) (субъединица 10 фактора инициации трансляции 3 эукариот)
Citrus lemon	V4T0Y1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T1Q6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T1U7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T2D9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T2M6	Бета-цепь тубулина
Citrus lemon	V4T3G2	Неохарактеризованный белок

Citrus lemon	V4T3P3	6-фосфоглюконатдегидрогеназа, декарбоксилирующая (EC 1.1.1.44)
Citrus lemon	V4T3V9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T3Y6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T4H3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T4I7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T4M7	Супероксиддисмутаза [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)
Citrus lemon	V4T539	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T541	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T576	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T5E1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T5I3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T5W7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T6T5	Кислый рибосомный белок P0 субъединицы 60S
Citrus lemon	V4T722	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T785	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T7E2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T7I7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T7N0	Субъединица протеасомы бета-типа (EC 3.4.25.1)
Citrus lemon	V4T7N4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T7T2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T7W5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T825	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T846	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T8E9	S-ацилтрансфераза (EC 2.3.1.225) (пальмитоилтрансфераза)
Citrus lemon	V4T8G2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T8G9	Хоризматсинтаза (EC 4.2.3.5)
Citrus lemon	V4T8Y6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T8Y8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T939	Карбоксипептидаза (EC 3.4.16.-)
Citrus lemon	V4T957	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T998	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4T9B9	Неохарактеризованный белок

Citrus lemon	V4T9Y7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TA70	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TAF6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TB09	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TB32	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TB89	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TBN7	Фосфоинозитидфосфолипаза C (EC 3.1.4.11)
Citrus lemon	V4TBQ3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TBS4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TBU3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TCA6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TCL3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TCS5	Пектатлиаза (EC 4.2.2.2)
Citrus lemon	V4TD99	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TDB5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TDI2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TDY3	Серин/треониновая протеинкиназа (EC 2.7.11.1)
Citrus lemon	V4TE72	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TE95	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TEC0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TED8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TES4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TEY9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TF24	Субъединица протеасомы альфа-типа (EC 3.4.25.1)
Citrus lemon	V4TF52	Уриказа (EC 1.7.3.3) (уратоксидаза)
Citrus lemon	V4TFV8	Каталаза (EC 1.11.1.6)
Citrus lemon	V4TGU1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TH28	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TH78	Ретикулон-подобный белок
Citrus lemon	V4THM9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TIU2	Рибулозо-фосфат-3-эпимераза (EC 5.1.3.1)
Citrus lemon	V4TIW6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TIY6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TIZ5	Неохарактеризованный белок

Citrus lemon	V4TJ75	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TJC3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TJQ9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TK29	Регуляторная субъединица NEDD8-активирующего фермента E1
Citrus lemon	V4TL04	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TLL5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TLP6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TM00	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TM19	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TMB7	Неохарактеризованный белок (фрагмент)
Citrus lemon	V4TMD1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TMD6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TMV4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TN30	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TN38	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TNY8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TP87	Карбоангидраза (EC 4.2.1.1) (карбонатдегидратаза)
Citrus lemon	V4TPM1	Гомосериндегидрогеназа (HDH) (EC 1.1.1.3)
Citrus lemon	V4TQB6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TQM7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TQR2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TQV9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TS21	Субъединица протеасомы бета-типа (EC 3.4.25.1)
Citrus lemon	V4TS28	Аннексин
Citrus lemon	V4TSD8	Неохарактеризованный белок (фрагмент)
Citrus lemon	V4TSF8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TSI9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TT89	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TTA0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TTR8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TTV4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TTZ7	Неохарактеризованный белок

Citrus lemon	V4TU54	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TVB6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TVG1	Фактор инициации трансляции эукариот 5A (eIF-5A)
Citrus lemon	V4TVJ4	Профилин
Citrus lemon	V4TVM6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TVM9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TVP7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TVT8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TW14	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TWG9	Субъединица-дельта белка 1 T-комплекса
Citrus lemon	V4TWU1	Вероятная бифункциональная метилтиорибулозо-1-фосфатдегидратаза/енолаза-фосфатаза E1 [включает: енолазу-фосфатазу E1 (EC 3.1.3.77) (2,3-дикето-5-метилтио-1-фосфопентанфосфатазу); метилтиорибулозо-1-фосфатдегидратазу (MTRu-1-P дегидратазу) (EC 4.2.1.109)]
Citrus lemon	V4TWX8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TXH0	Глутаматдекарбоксилаза (EC 4.1.1.15)
Citrus lemon	V4TXK9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TXU9	Тиаминтиазолсинтаза, хлоропластная (фермент биосинтеза тиазола)
Citrus lemon	V4TY40	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TYJ6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TYP5	Рибосомный белок L13 субъединицы 60S
Citrus lemon	V4TYP6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TYR6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TYZ8	Альфа-цепь тубулина
Citrus lemon	V4TZ91	Ингибитор диссоциации гуанозинуклеотиддифосфата
Citrus lemon	V4TZA8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TZJ1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TZK5	Неохарактеризованный белок

Citrus lemon	V4TZP2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TZT8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4TZU3	Митоген-активируемая протеинкиназа (EC 2.7.11.24)
Citrus lemon	V4TZU5	Дигидролипоилдегидрогеназа (EC 1.8.1.4)
Citrus lemon	V4TZZ0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U003	Субъединица K фактора инициации трансляции 3 эукариот (eIF3k) (eIF-3 p25)
Citrus lemon	V4U068	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U088	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U0J7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U133	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U1A8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U1K1	Ксилозоизомераза (EC 5.3.1.5)
Citrus lemon	V4U1M1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U1V0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U1X7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U1X9	Субъединица протеасомы бета-типа (EC 3.4.25.1)
Citrus lemon	V4U251	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U283	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U2E4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U2F7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U2H8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U2L0	Малатдегидрогеназа (EC 1.1.1.37)
Citrus lemon	V4U2L2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U2W4	Субъединица C протонной АТФазы V-типа
Citrus lemon	V4U3L2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U3W8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U412	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U4K2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U4M4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U4N5	Фактор инициации трансляции эукариот 6 (eIF-6)
Citrus lemon	V4U4S9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U4X3	Серингидроксиметилтрансфераза (EC 2.1.2.1)

Citrus lemon	V4U4Z9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U500	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U5B0	Субъединица E фактора инициации трансляции 3 эукариот (eIF3e) (субъединица 6 фактора инициации трансляции 3 эукариот)
Citrus lemon	V4U5B8	Глутатионпероксидаза
Citrus lemon	V4U5R5	Цитратсинтаза
Citrus lemon	V4U5Y8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U6I5	Субъединица бета АТФ-синтазы (EC 3.6.3.14)
Citrus lemon	V4U6Q8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U706	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U717	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U726	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U729	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U734	Серин/треониновая протеинфосфатаза (EC 3.1.3.16)
Citrus lemon	V4U7G7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U7H5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U7R1	Переносчик калия
Citrus lemon	V4U7R7	Митоген-активируемая протеинкиназа (EC 2.7.11.24)
Citrus lemon	V4U833	Малатдегидрогеназа
Citrus lemon	V4U840	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U8C3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U8J1	3-фосфошикимат-1-карбоксивинилтрансфераза (EC 2.5.1.19)
Citrus lemon	V4U8J8	Субъединица-гамма белка 1 T-комплекса
Citrus lemon	V4U995	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U999	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4U9C7	Субъединица D фактора инициации трансляции 3 эукариот (eIF3d) (субъединица 7 фактора инициации трансляции 3 эукариот) (eIF-3-дзета)
Citrus lemon	V4U9G8	Пролиниминопептидаза (EC 3.4.11.5)
Citrus lemon	V4U9L1	Неохарактеризованный белок

Citrus lemon	V4UA63	Фитохром
Citrus lemon	V4UAC8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UAR4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UB30	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UBK8	Субъединица a протонной АТФазы V-типа
Citrus lemon	V4UBL3	Субъединица альфа коатомера
Citrus lemon	V4UBL5	Неохарактеризованный белок (фрагмент)
Citrus lemon	V4UBM0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UBZ8	Аспартатаминотрансфераза (EC 2.6.1.1)
Citrus lemon	V4UC72	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UC97	Бета-глюкозидаза (EC 3.2.1.21)
Citrus lemon	V4UCE2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UCT9	Ацетил-коэнзим-А-синтетаза (EC 6.2.1.1)
Citrus lemon	V4UCZ1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UE34	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UE78	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UER3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UET6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UEZ6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UFD0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UFG8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UFK1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UG68	Субъединица I фактора инициации трансляции 3 эукариот (eIF3i)
Citrus lemon	V4UGB0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UGH4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UGL9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UGQ0	Убиквитинилгидролаза 1 (EC 3.4.19.12)
Citrus lemon	V4UH00	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UH48	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UH77	Субъединица протеасомы альфа-типа (EC 3.4.25.1)
Citrus lemon	V4UHD8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UHD9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UHF1	Неохарактеризованный белок

Citrus lemon	V4UHZ5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UI07	Рибосомный белок S8 субъединицы 40S
Citrus lemon	V4UI34	Субъединица L фактора инициации трансляции 3 эукариот (eIF3l)
Citrus lemon	V4UIF1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UIN5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UIX8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UJ12	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UJ42	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UJ63	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UJB7	Неохарактеризованный белок (фрагмент)
Citrus lemon	V4UJC4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UJX0	Фосфотрансфераза (EC 2.7.1.-)
Citrus lemon	V4UJY5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UK18	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UK52	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UKM9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UKS4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UKV6	Рибосомный белок SA субъединицы 40S
Citrus lemon	V4UL30	Субъединица-бета пирофосфат-фруктозо-6-фосфат-1-фосфатрансферазы (PFP) (EC 2.7.1.90) (6-фосфофруктокиназа, пирофосфат-зависимая) (PPi-PFK) (пирофосфат-зависимая 6-фосфофруктозо-1-киназа)
Citrus lemon	V4UL39	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4ULH9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4ULL2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4ULS0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UMU7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UN36	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UNT5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UNW1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UP89	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UPE4	Неохарактеризованный белок

Citrus lemon	V4UPF7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UPK0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UPX5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UQ58	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UQF6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UR21	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UR80	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4URK3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4URT3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4US96	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4USQ8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UT16	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UTC6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UTC8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UTP6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UTY0	Субъединица протеасомы альфа-типа (EC 3.4.25.1)
Citrus lemon	V4UU96	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UUB6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UUJ9	Аминопептидаза (EC 3.4.11.-)
Citrus lemon	V4UUK6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UV09	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UV83	Лизин-тРНК-лигаза (EC 6.1.1.6) (лизил-тРНК-синтетаза)
Citrus lemon	V4UVJ5	Диацилглицеринкиназа (DAG киназа) (EC 2.7.1.107)
Citrus lemon	V4UW03	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UW04	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UWR1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UWV8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4UX36	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4V003	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4V0J0	Рибосомный белок S26 субъединицы 40S
Citrus lemon	V4V1P8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4V4V0	Неохарактеризованный белок

Citrus lemon	V4V5T8	Убиквитин-подобный модификатор укладки 1
Citrus lemon	V4V600	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4V622	Альдегиддегидрогеназа
Citrus lemon	V4V6W1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4V6Z2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4V738	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4V8H5	Белок 35, связанный с вакуольной сортировкой белков
Citrus lemon	V4V9P6	Субъединица F фактора инициации трансляции 3 эукариот (eIF3f) (eIF-3-эпсилон)
Citrus lemon	V4V9V7	Тяжелая цепь клатрина
Citrus lemon	V4V9X3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VAA3	Супероксиддисмутаза (EC 1.15.1.1)
Citrus lemon	V4VAF3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VBQ0	Неохарактеризованный белок (фрагмент)
Citrus lemon	V4VCL1	Субъединица протеасомы бета-типа (EC 3.4.25.1)
Citrus lemon	V4VCZ9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VDK1	Пептидилпропилизомераза (EC 5.2.1.8)
Citrus lemon	V4VEA1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VEB3	Аланин-тРНК-лигаза (EC 6.1.1.7) (аланил-тРНК-синтетаза) (AlaRS)
Citrus lemon	V4VEE3	Глутаминсинтетаза (EC 6.3.1.2)
Citrus lemon	V4VFM3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VFN5	Субъединица протеасомы бета-типа (EC 3.4.25.1)
Citrus lemon	V4VGD6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VGL9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VHI6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VIP4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VJT4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VK14	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VKI5	Протеин-L-изоаспартат-O-метилтрансфераза (EC 2.1.1.77)
Citrus lemon	V4VKP2	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (EC 1.2.1.-)

Citrus lemon	V4VL73	Ацил-коэнзим-А-оксидаза
Citrus lemon	V4VLL7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VN43	Неохарактеризованный белок (фрагмент)
Citrus lemon	V4VQH3	Метилентетрагидрофолатредуктаза (EC 1.5.1.20)
Citrus lemon	V4VTC9	Неохарактеризованный белок (фрагмент)
Citrus lemon	V4VTT4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VTY7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VU14	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VU32	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VUK6	S-(гидроксиметил)глутатиондегидрогеназа (EC 1.1.1.284)
Citrus lemon	V4VVR8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VXE2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VY37	Фосфоманномутаза (EC 5.4.2.8)
Citrus lemon	V4VYC0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VYV1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VZ80	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4VZJ7	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4W2P2	Альфа-маннозидаза (EC 3.2.1.-)
Citrus lemon	V4W2Z9	Белок хлоридного канала
Citrus lemon	V4W378	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4W4G3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4W5F1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4W5N8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4W5U2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4W6G1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4W730	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4W7J4	Obg-подобная АТФаза 1
Citrus lemon	V4W7L5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4W8C5	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4W8C9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4W8D3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4W951	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4W9F6	Рибосомный белок L18a субъединицы 60S

Citrus lemon	V4W9G2	Неохарактеризованный белок (фрагмент)
Citrus lemon	V4W9L3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4W9Y8	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4WAP9	Бета-субъединица коатомера (белок бета-оболочки)
Citrus lemon	V4WBK6	Субъединица 7 комплекса цитохрома b-c1
Citrus lemon	V4WC15	Малатдегидрогеназа
Citrus lemon	V4WC19	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4WC74	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4WC86	Регуляторная субъединица B 55 кДа серин/треониновой протеинфосфатазы 2A
Citrus lemon	V4WCS4	GTP-связывающий ядерный белок
Citrus lemon	V4WD80	Аспартатаминотрансфераза (EC 2.6.1.1)
Citrus lemon	V4WDK0	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4WDK3	АТФ-зависимая 6-фосфофруктокиназа (ATP-PFK) (фосфофруктокиназа) (EC 2.7.1.11) (фосфогексокиназа)
Citrus lemon	V4WE00	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4WEE3	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4WEN2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4WG97	Белок, родственный белкам системы аутофагии
Citrus lemon	V4WGV2	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4WGW5	Уридинкиназа (EC 2.7.1.48)
Citrus lemon	V4WHD4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4WHF8	Сахарозосинтаза (EC 2.4.1.13)
Citrus lemon	V4WHK2	Пектинэстераза (EC 3.1.1.11)
Citrus lemon	V4WHQ4	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4WHT6	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4WJ93	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4WJA9	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V4WJB1	Неохарактеризованный белок
Citrus lemon	V9HXG3	Протеиндисульфидизомераза (EC 5.3.4.1)
Citrus lemon	W8Q8K1	Предположительная пирофосфатаза неорганического фосфата

Citrus lemon	W8QJL0	Предположительная изопентенилпирофосфатизомераза
Виноград	Номер доступа	Идентифицированные белки
Виноград	A5C5K3 (+2)	Аденозилгомоцистеиназа
Виноград	Q9M6B5	Алкогольдегидрогеназа 6
Виноград	A3FA65 (+1)	Аквапорин PIP1;3
Виноград	Q0MX13 (+2)	Аквапорин PIP2;2
Виноград	A3FA69 (+4)	Аквапорин PIP2;4
Виноград	A5AFS1 (+2)	Фактор элонгации 1-альфа
Виноград	UPI0001985702	Фактор элонгации 2
Виноград	D7T227	Енолаза
Виноград	D7TJ12	Енолаза
Виноград	A5B118 (+1)	Фруктозо-бисфосфатальдолаза
Виноград	E0CQ39	Глюкозо-6-фосфатизомераза
Виноград	D7TW04	Глутатионпероксидаза
Виноград	A1YW90 (+3)	Глутатион-S-трансфераза
Виноград	A5BEW0	Гистон H4
Виноград	UPI00015C9A6A	HSC70-1 (когнатный белок 1 теплового шока 70 кДа); АТФ-связывающая изоформа 1
Виноград	D7FBC0 (+1)	Малатдегидрогеназа
Виноград	D7TBH4	Малатдегидрогеназа
Виноград	A5ATB7 (+1)	Метилентетрагидрофолатредуктаза
Виноград	A5JPK7 (+1)	Монодегидроаскорбатредуктаза
Виноград	A5AKD8	Пептидилпролил-цис-транс-изомераза
Виноград	A5BQN6	Пептидилпролил-цис-транс-изомераза
Виноград	A5CAF6	Фосфоглицераткиназа
Виноград	Q09VU3 (+1)	Фосфолипаза D
Виноград	D7SK33	Фосфорилаза

Виноград	A5AQ89	Профилин
Виноград	C5DB50 (+2)	Предположительная 2,3-бисфосфоглицерат-независимая фосфоглицератмутаза
Виноград	D7TIZ5	Пируваткиназа
Виноград	A5BV65	Триозофосфатизомераза
Грейпфрут	G8Z362 (+1)	(E)-бета-фарнезенсинтаза
Грейпфрут	Q5CD81	(E)-бета-оцименсинтаза
Грейпфрут	D0UZK1 (+2)	1,2-рамнозилтрансфераза
Грейпфрут	A7ISD3	1,6-рамнозилтрансфераза
Грейпфрут	Q80H98	Белок с молекулярной массой 280 кДа
Грейпфрут	Q15GA4 (+2)	Полипротеин с молекулярной массой 286 кДа
Грейпфрут	D7NHW9	2-фосфо-D-глицератгидролаза
Грейпфрут	D0EAL9	Полипротеин с молекулярной массой 349 кДа
Грейпфрут	Q9DTG5	Полипротеин с молекулярной массой 349 кДа
Грейпфрут	O22297	Кислая целлюлаза
Грейпфрут	Q8H986	Кислая хитиназа класса I
Грейпфрут	D3GQL0	Аконитатгидратаза 1
Грейпфрут	K7N8A0	Актин
Грейпфрут	A8W8Y0	Алкогольацилтрансфераза
Грейпфрут	Q84V85	Алленоксидсинтаза
Грейпфрут	F8WL79	Аминопептидаза
Грейпфрут	Q09MG5	Апоцитохром f
Грейпфрут	J7EIR8	Аскорбатпероксидаза
Грейпфрут	B9VRH6	Аскорбатпероксидаза
Грейпфрут	G9I820	Фактор ответа на ауксин
Грейпфрут	J7ICW8	Бета-амилиза
Грейпфрут	Q8L5Q9	Бета-галактозидаза
Грейпфрут	A7BG60	Бета-пиненсинтаза
Грейпфрут	C0KLD1	Бета-тубулин
Грейпфрут	Q91QZ1	Капсидный белок
Грейпфрут	Q3SAK9	Капсидный белок
Грейпфрут	D2U833	Котранспортер катионов и хлорида

Грейпфрут	C3VPJ0 (+3)	Хальконсинтаза
Грейпфрут	D5LM39	Белок хлоридного канала
Грейпфрут	Q9M4U0	Циннамат-4-гидроксилаза CYP73
Грейпфрут	Q39627	Цитрин
Грейпфрут	G2XKD3	Белок оболочки
Грейпфрут	Q3L2I6	Белок оболочки
Грейпфрут	D5FV16	CRT/DRE-связывающий фактор
Грейпфрут	Q8H6S5	CTV.2
Грейпфрут	Q8H6Q8	CTV.20
Грейпфрут	Q8H6Q7	CTV.22
Грейпфрут	Q1I1D7	Цитохром P450
Грейпфрут	Q7Y045	Дегидрин
Грейпфрут	F8WLD2	Белок эксцизионной репарации ДНК
Грейпфрут	Q09MI8	Субъединица бета" ДНК-зависимой РНК-полимеразы
Грейпфрут	D2WKC9	Белок ответа на этилен 1
Грейпфрут	D2WKD2	Сенсор ответа на этилен 1
Грейпфрут	D7PVG7	Белок 1, подобный нечувствительному к этилену белку 3
Грейпфрут	G3CHK8	Субъединица E фактора инициации трансляции 3 эукариот
Грейпфрут	A9NJG4 (+3)	Гидропероксидлиаза жирных кислот
Грейпфрут	B8Y9B5	Белок семейства F-box
Грейпфрут	Q000W4	Fe (III)-хелатредуктаза
Грейпфрут	Q6Q3H4	Фруктокиназа
Грейпфрут	F8WL95	Gag-pol-полипротеин
Грейпфрут	Q8L5K4	Гамма-терпиненсинтаза, хлоропластная
Грейпфрут	Q9SP43	Глюкозо-1-фосфатаденилилтрансфераза
Грейпфрут	Q3HM93	Глутатион-S-трансфераза
Грейпфрут	D0VEW6	Транскрипционный фактор семейства GRAS
Грейпфрут	F8WL87	Белок теплового шока
Грейпфрут	H9NHK0	Hsp90
Грейпфрут	Q8H6R4	Jp18
Грейпфрут	G3CHK6	Белок семейства белков с богатыми лейцином

		повторами
Грейпфрут	B2YGX9 (+1)	Лимоноид-UDP-глюкозилтрансфераза
Грейпфрут	Q05KK0	Белок MADS-box
Грейпфрут	F8WLB4	Белок, содержащий домен механочувствительного ионного канала
Грейпфрут	Q5CD82	Монотерпенсинтаза
Грейпфрут	F8WLC4	Транскрипционный фактор MYB
Грейпфрут	A5YWA9	Белок с доменом NAC
Грейпфрут	Q09MC9	Субъединица 5 NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы, хлоропластная
Грейпфрут	Q8H6R9	Белок устойчивости к заболеваниям типа NBS-LRR
Грейпфрут	Q8H6S0	Белок устойчивости к заболеваниям типа NBS-LRR
Грейпфрут	Q8H6R6	Белок устойчивости к заболеваниям типа NBS-LRR
Грейпфрут	J9WR93	p1a
Грейпфрут	Q1X8V8	P23
Грейпфрут	E7DSS0 (+4)	P23
Грейпфрут	G0Z9I6	p27
Грейпфрут	I3XHN0	p33
Грейпфрут	B8YDL3	Белок p33
Грейпфрут	B9VB22	Белок p33
Грейпфрут	P87587	P346
Грейпфрут	B9VB56	Белок p349
Грейпфрут	I3RWW7	Белок p349
Грейпфрут	B9VB20	Белок p349
Грейпфрут	Q9WID7	Белок p349
Грейпфрут	Q2XP16	P353
Грейпфрут	O04886 (+1)	Пектинэстераза 1
Грейпфрут	F8WL74	Пептидилпролил-цис-транс-изомераза
Грейпфрут	Q0ZA67	Пероксидаза
Грейпфрут	F1CT41	Фосфоенолпируваткарбоксилаза

Грейпфрут	B1PBV7 (+2)	Фитоенсинтаза
Грейпфрут	Q9ZWQ8	Белок, ассоциированный с липидами пластид, хлоропластный
Грейпфрут	Q94FM1	Полипротеин Pol
Грейпфрут	Q94FM0	Полипротеин Pol
Грейпфрут	G9I825	Поли-C-связывающий белок
Грейпфрут	O64460 (+7)	Ингибитор полигалактуроназы
Грейпфрут	I3XHM8	Полипротеин
Грейпфрут	C0STR9	Полипротеин
Грейпфрут	H6U1F0	Полипротеин
Грейпфрут	B8QHP8	Полипротеин
Грейпфрут	I3V6C0	Полипротеин
Грейпфрут	C0STS0	Полипротеин
Грейпфрут	K0FGH5	Полипротеин
Грейпфрут	Q3HWZ1	Полипротеин
Грейпфрут	F8WLA5	PPR-содержащий белок
Грейпфрут	Q06652 (+1)	Вероятная фосфолипидгидропероксидглутатион-пероксидаза
Грейпфрут	P84177	Профилин
Грейпфрут	Q09MB4	Белок ycf2
Грейпфрут	A8C183	Субъединица II реакционного центра PSI
Грейпфрут	A5JVP6	Предположительный белок 2b
Грейпфрут	D0EFM2	Предположительный фактор инициации трансляции эукариот 1
Грейпфрут	Q18L98	Предположительный полипротеин gag-pol
Грейпфрут	B5AMI9	Предположительный двигательный белок
Грейпфрут	A1ECK5	Предположительный белок с "цинковыми пальцами", реагирующий на множественные стрессы
Грейпфрут	B5AMJ0	Предположительный полипротеин репликазы
Грейпфрут	I7CYN5	Предположительная РНК-зависимая РНК-полимераза
Грейпфрут	Q8RVR2	Предположительная терпенсинтаза
Грейпфрут	B5TE89	Предположительный неохарактеризованный белок

Грейпфрут	Q8JVF3	Предположительный неохарактеризованный белок
Грейпфрут	F8WLB0	Предположительный неохарактеризованный белок ORF43
Грейпфрут	A5JVP4	Предположительная вирусная репликаза
Грейпфрут	M1JAW3	Репликаза
Грейпфрут	H6VXK8	Полипротеин репликазы
Грейпфрут	J9UF50 (+1)	Белок 1a репликазы
Грейпфрут	J9RV45	Белок 2a репликазы
Грейпфрут	Q5EGG5	Полипротеин, ассоциированный с репликазой
Грейпфрут	G9I823	Белок 1 с мотивом распознавания РНК
Грейпфрут	J7EPC0	РНК-зависимая РНК-полимераза
Грейпфрут	Q6DN67	РНК-направляемая РНК-полимераза L
Грейпфрут	A9CQM4	Гомолог SEPALLATA1
Грейпфрут	Q9SLS2	Сахарозосинтаза
Грейпфрут	Q9SLV8 (+1)	Сахарозосинтаза
Грейпфрут	Q38JC1	Индуцируемый температурой липокалин
Грейпфрут	D0ELH6	Тиоредоксин, содержащий тетратрикопептидный домен
Грейпфрут	D2KU75	Тауматин-подобный белок
Грейпфрут	C3VIC2	Фактор элонгации трансляции
Грейпфрут	D5LY07	Убиквитин/рибосомный слитый белок
Грейпфрут	C6KI43	Белок семейства 1 UDP-глюкозилтрансферазы
Грейпфрут	A0FKR1	Вакуольный симпортер цитрата/H+
Грейпфрут	Q944C8	Вакуольная инвертаза
Грейпфрут	Q9MB46	Субъединица E протонной АТФазы V-типа
Грейпфрут	F8WL82	Белок семейства белков с повтором WD-40
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0080391	Hsp90
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0408351	Hsp90
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0408441	Hsp90
Helianthuus annuus	HanXRQChr 14g0462551	Hsp90

Helianthuus annuus	HanXRQChr 02g0044471	Hsp70
Helianthuus annuus	HanXRQChr 02g0044481	Hsp70
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0132631	Hsp70
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0134631	Hsp70
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0134801	Hsp70
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0299441	Глутатион-S-трансфераза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0516291	Глутатион-S-трансфераза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0091431	Лактат/малатдегидрогеназа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0421951	Лактат/малатдегидрогеназа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0304821	Лактат/малатдегидрогеназа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 12g0373491	Лактат/малатдегидрогеназа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 01g0031071	Суперсемейство малых GTPаз, Rab-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 01g0031091	Суперсемейство малых GTPаз, Rab-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 02g0050791	Суперсемейство малых GTPаз, Rab-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0353711	Суперсемейство малых GTPаз, Rab-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0402771	Суперсемейство малых GTPаз, Rab-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 07g0190171	Изоцитрат/изопропилмалатдегидрогеназа

Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0532251	Изоцитрат/изопропилмалатдегидрогеназа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0079131	Фосфоенолпируваткарбоксилаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 15g0495261	Фосфоенолпируваткарбоксилаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0388931	Фосфоенолпируваткарбоксилаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 14g0442731	Фосфоенолпируваткарбоксилаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 15g0482381	UTP-глюкозо-1-фосфатуридилилтрансфераза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0532261	UTP-глюкозо-1-фосфатуридилилтрансфераза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0135591	Тубулин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 06g0178921	Тубулин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 08g0237071	Тубулин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0337991	Тубулин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0407921	Тубулин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0145191	Тубулин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 07g0187021	Тубулин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 07g0189811	Тубулин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0253681	Тубулин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0288911	Тубулин

Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0322631	Тубулин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 12g0367231	Тубулин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0386681	Тубулин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0393261	Тубулин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 12g0371591	Убиквитин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 12g0383641	Убиквитин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0569881	Убиквитин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 06g0171511	Фотосистема II HCF136, фактор стабильности/сборки
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0544921	Фотосистема II HCF136, фактор стабильности/сборки
Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0526461	Субъединица протеасомы B-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0565551	Субъединица протеасомы B-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0149801	Субъединица протеасомы B-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0241421	Субъединица протеасомы B-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0353161	Субъединица протеасомы B-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0506311	Семейство ингибиторов протеиназ I3 (Кунитца)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0506331	Семейство ингибиторов протеиназ I3 (Кунитца)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0265401	Металлопептидаза (семейство M10)

Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0265411	Металлопептидаза (семейство M10)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0154561	АТФаза, AAA-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 08g0235061	АТФаза, AAA-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0273921	АТФаза, AAA-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0498881	АТФаза, AAA-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 02g0058711	Дегидрогеназа-ацилтрансфераза оксокислот
Helianthuus annuus	HanXRQChr 08g0214191	Дегидрогеназа-ацилтрансфераза оксокислот
Helianthuus annuus	HanXRQChr 08g0208631	Суперсемейство малых GTPаз, SAR1-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0331441	Суперсемейство малых GTPаз, SAR1-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 12g0371571	Суперсемейство малых GTPаз, SAR1-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 12g0383571	Суперсемейство малых GTPаз, SAR1-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 14g0446771	Суперсемейство малых GTPаз, SAR1-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0539461	Суперсемейство малых GTPаз, SAR1-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0548271	Суперсемейство малых GTPаз, SAR1-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0569871	Суперсемейство малых GTPаз, SAR1-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0311201	АТФаза, комплекс V1, субъединица A
Helianthuus annuus	HanXRQChr 12g0359711	АТФаза, комплекс V1, субъединица A

Helianthuus annuus	HanXRQChr 04g0124671	Фруктозо-1,6-бифосфатаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 06g0176631	Фруктозо-1,6-бифосфатаза
Helianthuus annuus	HanXRQCPg 0579861	Фотосистема II PsbD/D2, реакционный центр
Helianthuus annuus	HanXRQChr 00c0439g057 4731	Фотосистема II PsbD/D2, реакционный центр
Helianthuus annuus	HanXRQChr 04g0099321	Фотосистема II PsbD/D2, реакционный центр
Helianthuus annuus	HanXRQChr 08g0210231	Фотосистема II PsbD/D2, реакционный центр
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0326671	Фотосистема II PsbD/D2, реакционный центр
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0549121	Фотосистема II PsbD/D2, реакционный центр
Helianthuus annuus	HanXRQCPg 0579731	Фотосистема II, белок D1
Helianthuus annuus	HanXRQChr 00c0126g057 1821	Фотосистема II, белок D1
Helianthuus annuus	HanXRQChr 00c0165g057 2191	Фотосистема II, белок D1
Helianthuus annuus	HanXRQChr 00c0368g057 4171	Фотосистема II, белок D1
Helianthuus annuus	HanXRQChr 00c0454g057 4931	Фотосистема II, белок D1
Helianthuus annuus	HanXRQChr 00c0524g057 5441	Фотосистема II, белок D1

Helianthuus annuus	HanXRQChr 00c0572g057 5941	Фотосистема II, белок D1
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0257281	Фотосистема II, белок D1
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0326571	Фотосистема II, белок D1
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0327051	Фотосистема II, белок D1
Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0503941	Фотосистема II, белок D1
Helianthuus annuus	HanXRQCPg 0580061	Фотосистема II, цитохром b559
Helianthuus annuus	HanXRQChr 01g0020331	Фотосистема II, цитохром b559
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0283581	Фотосистема II, цитохром b559
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0284271	Фотосистема II, цитохром b559
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0289291	Фотосистема II, цитохром b559
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0318171	Фотосистема II, цитохром b559
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0326851	Фотосистема II, цитохром b559
Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0529011	Фотосистема II, цитохром b559
Helianthuus annuus	HanXRQChr 08g0219051	Хлорофилл A-B-связывающий белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 12g0370841	Хлорофилл A-B-связывающий белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 02g0053151	Хлорофилл A-B-связывающий белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr	Хлорофилл A-B-связывающий белок

	02g0053161	
Helianthuus annuus	HanXRQCPg0580051	Цитохром f
Helianthuus annuus	HanXRQChr01g0020341	Цитохром f
Helianthuus annuus	HanXRQChr10g0283571	Цитохром f
Helianthuus annuus	HanXRQChr10g0284261	Цитохром f
Helianthuus annuus	HanXRQChr10g0289281	Цитохром f
Helianthuus annuus	HanXRQChr10g0318181	Цитохром f
Helianthuus annuus	HanXRQChr11g0326841	Цитохром f
Helianthuus annuus	HanXRQChr15g0497521	Цитохром f
Helianthuus annuus	HanXRQChr06g0163851	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr09g0252071	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr12g0374041	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr04g0128141	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr05g0163131	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr03g0076971	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr05g0159851	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr05g0159971	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr	Рибосомный белок

	11g0324631	
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0408051	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0089331	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0419951	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 15g0497041	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0499761	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 04g0106961	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 06g0175811	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 04g0122771	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0245691	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0520021	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0060471	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 14g0429531	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 06g0171911	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 15g0479091	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 15g0479101	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0543641	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr	Рибосомный белок

	17g0543661	
Helianthuus annuus	HanXRQChr 04g0105831	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0258341	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0287141	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 15g0463911	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0076171	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0159291	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0407551	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 12g0380701	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 15g0477271	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0545211	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0570741	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0570761	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 02g0044021	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0152871	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 01g0012781	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 08g0230861	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr	Рибосомный белок

	13g0391831	
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0337791	Бифункциональный ингибитор трипсина/альфа-амилазы
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0312371	Дегидрогеназа-ацилтрансфераза 2-оксокислот
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0276191	Кислая фосфатаза (класс B)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0142271	Альдозо-1-эпимераза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 14g0439791	Альфа-D-фосфогексомутаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0251071	Альфа-L-фукозидаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0147371	Аннексин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0247561	Протеаза Asp (семейство A1 пептидаз)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0409681	Фермент берберинового мостика, (S) ретикулин:кислород-оксидоредуктаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0295971	Бета-гидроксиацил-(ацил-белок-носитель)-дегидратаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0412571	Карбогидратэстераза семейства 13 - CE13 (пектинацилэстераза - PAE)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 12g0360101	Карбогидратэстераза семейства 8 - CE8 (пектинметилэстераза - PME)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 01g0019231	Карбоангидраза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 02g0036611	Белок, осуществляющий клеточное связывание ретинальдегида/транспорт альфа-токоферола
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0313581	Шаперонин Cpn60
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0251791	Клатрин
Helianthuus annuus	HanXRQChr	Хлорофилл A-B-связывающий белок

	11g0329811	
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0398861	Кобаламин (витамин B12) -независимая метионинсинтаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0298981	Циклофилин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 04g0103281	Цис-протеаза (семейство папаина)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0268361	Цитохром P450
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0535591	Диригентный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0065901	Экспансин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0336761	Экспрессируемый белок (домен Cupin, домен запасного белка семян)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0280931	Экспрессируемый белок (домен Cupin, домен запасного белка семян)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0288971	Экспрессируемый белок (домен Cupin, домен запасного белка семян)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 12g0380361	Экспрессируемый белок (домен Cupin, домен запасного белка семян)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0254381	Экспрессируемый белок (домен Cupin, домен запасного белка семян)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 04g0112711	Экспрессируемый белок (домен Cupin, домен запасного белка семян)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 07g0196131	Экспрессируемый белок (домен Cupin, домен запасного белка семян)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0301281	Экспрессируемый белок (домен Cupin, домен запасного белка семян)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0301931	Экспрессируемый белок (домен Cupin, домен запасного белка семян)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0404461	Экспрессируемый белок (домен Cupin)
Helianthuus annuus	HanXRQChr	Экспрессируемый белок (DUF642)

	01g0015821	
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0065301	Экспрессируемый белок (Gnk2-гомологичный домен, противогрибковый белок из семян гинкго)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0068311	Экспрессируемый белок (домены LRR)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0291371	Экспрессируемый белок (домены LRR)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0075061	Фасциклин-подобный арабиногалактановый белок (FLA)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 08g0221961	Ферритин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0257521	FMN-зависимая дегидрогеназа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 14g0441641	Фруктозо-бисфосфатальдолаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0312621	Гермин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0244271	Глюкозометанолхолиноксидоредуктаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0061571	Глутаматсинтаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0144801	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0550211	Глицерофосфорилдиэфирфосфодиэстераза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 06g0175391	Семейство гликозилгидролаз 16 - GH16 (эндоксилоглюкантрансфераза)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0351571	Семейство гликозидгидролаз 17 - GH17 (бета-1,3-глюкозидаза)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0141461	Семейство гликозидгидролаз 18 - GH18
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0276721	Семейство гликозидгидролаз 19 - GH19
Helianthuus annuus	HanXRQChr	Семейство гликозидгидролаз 2 - GH2

	02g0046191	
Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0524981	Семейство гликозидгидролаз 20 - GH20 (N-ацетил-бета-глюкозаминидаза)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0322851	Семейство гликозидгидролаз 27 - GH27 (альфа-галактозидаза/мелибиаза)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0293191	Семейство гликозидгидролаз 3 - GH3
Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0511881	Семейство гликозидгидролаз 31 - GH31 (альфа-ксилозидаза)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 14g0461441	Семейство гликозидгидролаз 32 - GH32 (вакуольная инвертаза)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0423671	Семейство гликозидгидролаз 35 - GH35 (бета-галактозидаза)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0319301	Семейство гликозидгидролаз 35 - GH35 (бета-галактозидаза)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 09g0256531	Семейство гликозидгидролаз 38 - GH38 (альфа-маннозидаза)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0320901	Семейство гликозидгидролаз 5 - GH5 (глюкан-1,3-бета-глюкозидаза)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0130491	Семейство гликозидгидролаз 51 - GH51 (альфа-арабинофуранозидаза)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0314191	Семейство гликозидгидролаз 79 - GH79 (эндо-бета-глюкуронидаза/гепараназа,
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0397411	гомологичная PMR5 *A. thaliana* (устойчивость к мучнистой росе) (ацилирование углеводов)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 14g0444681	Семейство ингибиторов I3 (семейство Кунитца-P)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 14g0445181	Лактат/малатдегидрогеназа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0564111	Лектин (D-манноза)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 17g0558861	Лектин (домен PAN-2)
Helianthuus annuus	HanXRQChr	Липаза-ацилгидролаза (семейство GDSL)

	02g0039251	
Helianthuus annuus	HanXRQChr 01g0000161	Белок-переносчик липидов/ингибитор трипсина-альфа-амилазы
Helianthuus annuus	HanXRQChr 02g0047121	Лектин, связывающий маннозу
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0303361	Митохондриальный белок-носитель
Helianthuus annuus	HanXRQChr 15g0489551	Оксидаза с несколькими атомами меди
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0135581	Нейтральная/щелочная нелизосомная церамидаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 01g0017621	Нуклеозиддифосфаткиназа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0295991	Пероксидаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0398251	Пероксиредоксин
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0333171	Фосфат-индуцированный (phi) белок 1
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0060421	Фосфодиэстераза/нуклеотидпирофосфатаза/фосфаттрансфераза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0078011	Фосфофруктокиназа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 13g0408831	Фосфоглицераткиназа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 10g0286701	Фосфоглицератмутаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 06g0171591	PsbP фотосистемы II, кислород-выделяющий комплекс
Helianthuus annuus	HanXRQChr 14g0434951	Белок, ассоциированный с липидами пластид/консервативный домен фибриллина
Helianthuus annuus	HanXRQChr 05g0146621	Пластоцианин (голубой медь-связывающий белок)
Helianthuus annuus	HanXRQChr	Полифенолоксидаза

	11g0330251	
Helianthuus annuus	HanXRQChr 04g0094541	Субъединица протеасомы A-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0081271	Субъединица протеасомы B-типа
Helianthuus annuus	HanXRQChr 12g0356851	Пурпурная кислая фосфатаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 15g0485781	Пиридоксальфосфат-зависимая трансфераза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0336791	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0330521	Рибосомный белок
Helianthuus annuus	HanXRQChr 11g0326801	Рибулозобисфосфаткарбоксилаза, большая субъединица
Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0523951	Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза, малая субъединица
Helianthuus annuus	HanXRQChr 01g0022151	S-аденозил-L-гомоцистеингидролаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 14g0454811	S-аденозилметионинсинтетаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 04g0109991	SCP-подобный внеклеточный белок (PR-1)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 03g0072241	Сериновая карбоксипептидаза (семейство пептидаз S10)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 12g0377221	Сериновая протеаза (субтилизин) (семейство пептидаз S8)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 02g0055581	Супероксиддисмутаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr 15g0493261	Тауматин (PR5)
Helianthuus annuus	HanXRQChr 16g0532531	Транскетолаза
Helianthuus annuus	HanXRQChr	Фактор элонгации трансляции EFTu/EF1A

	07g0197421	
Helianthuus annuus	HanXRQChr 06g0173951	Трансляционно контролируемый опухолевый белок

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ введения гетерологичной РНК в растение, причем способ предусматривает доставку в растение композиции, содержащей совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), при этом каждый из совокупности содержит гетерологичную РНК, где композицию доставляют в концентрации, эффективной для увеличения приспособленности растения.

2. Способ по п. 1, где гетерологичная РНК представляет собой направляющую РНК (gRNA).

3. Способ по п. 2, где gRNA является компонентом рибонуклеопротеинового комплекса (RNP), и где каждый из совокупности PMP содержит RNP.

4. Способ по п. 1, где PMP представляют собой восстановленные из липидов PMP (LPMP).

5. Способ по п. 1, где гетерологичная РНК инкапсулирована с помощью PMP.

6. Способ по п. 1, где каждый из PMP предусматривает очищенную растительную внеклеточную везикулу (EV).

7. Способ по п. 1, где PMP в композиции находятся в концентрации, эффективной для модификации признака растения, где модификация повышает приспособленность растения.

8. Способ по п. 1, где повышение приспособленности растения представляет собой ускорение развития, роста, повышение урожайности, устойчивости к абиотическим стрессовым факторам или устойчивости к биотическим стрессовым факторам.

9. Способ по п. 1, где повышение приспособленности растения представляет собой модификацию времени цветения.

10. Способ по п. 1, где повышение приспособленности растения представляет собой повышение качества продуктов, собираемых с растения.

11. Способ по п. 1, где повышение приспособленности растения представляет собой улучшение вкуса, внешнего вида или срока хранения продукта, собираемого с растения.

12. Способ по п. 1, где повышение приспособленности представляет собой снижение продуцирования аллергена, который стимулирует иммунный ответ у животного.

13. Композиция для модификации растений, содержащая совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), где PMP содержат средство, модифицирующее растения.

14. Композиция для модификации растений, содержащая совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), где PMP содержат средство, модифицирующее растения, и PMP в композиции находятся в концентрации, эффективной для модификации признака растения, где модификация повышает приспособленность растения.

15. Композиция для модификации растений, содержащая совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), где PMP содержат гетерологичную нуклеиновую кислоту, и PMP в композиции находятся в концентрации, эффективной для повышения

приспособленности растения.

16. Композиция для модификации растений, содержащая совокупность пакетов-мессенджеров растений (PMP), где PMP содержат гетерологичный пептид, и PMP в композиции находятся в концентрации, эффективной для повышения приспособленности растения.

17. Композиция для модификации растений, содержащая совокупность PMP, где PMP получены посредством способа, который предусматривает стадии:

(a) получения исходного образца из растения или его части, где растение или его часть содержат EV;

(b) выделения фракции неочищенных PMP из исходного образца, где фракция неочищенных PMP характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем в исходном образце;

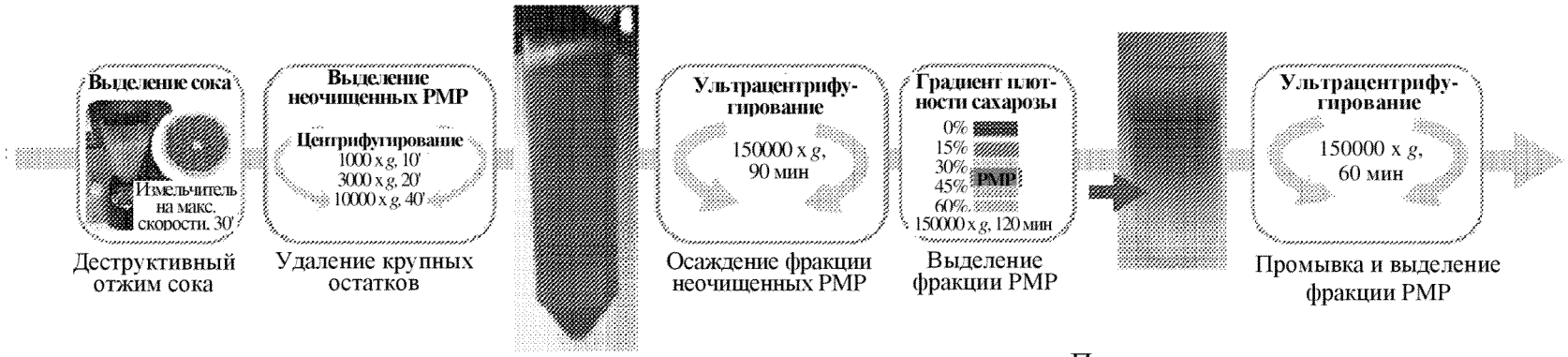
(c) очистки фракции неочищенных PMP, за счет чего получают совокупность чистых PMP, где совокупность чистых PMP характеризуется пониженным уровнем по меньшей мере одного контаминанта или нежелательного компонента из растения или его части по сравнению с уровнем во фракции неочищенных EV;

(d) загрузки совокупности чистых PMP средством, модифицирующим растения; и

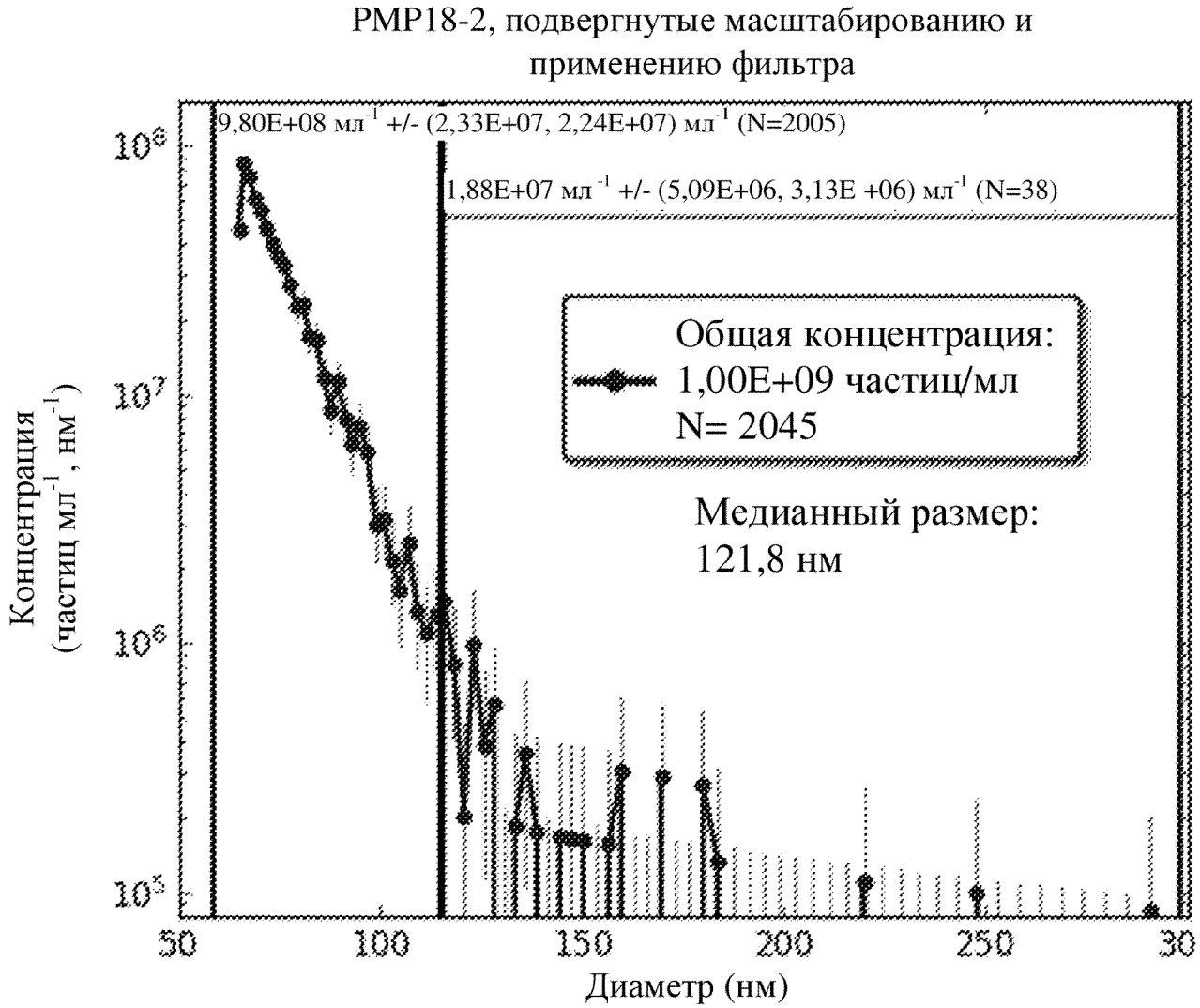
(e) составления PMP из стадии (d) для доставки в растение.

По доверенности

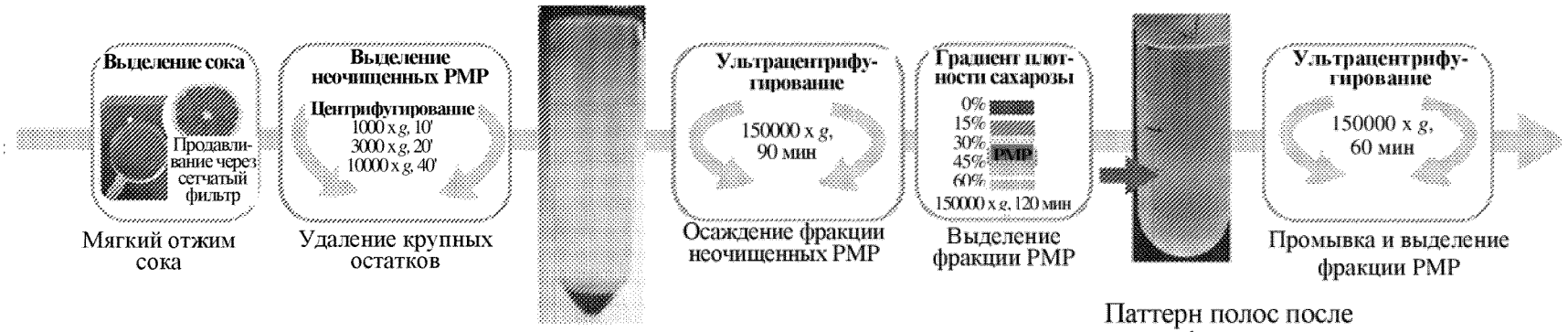
Фиг. 1А


Выделение сока
Измельчитель на макс. скорости, 30'
Деструктивный отжим сока
Выделение неочищенных PMP
Центрифугирование
1000 x g, 10'
3000 x g, 20'
10000 x g, 40'
Удаление крупных остатков
Сок после центрифугирования при 1000 × g в течение 10 мин
Ультрацентрифугирование
150000 x g, 90 мин
Осаждение фракции неочищенных PMP
Градиент плотности сахарозы
0%
15%
30%
45%
PMP
60%
150000 x g, 120 мин
Выделение фракции PMP
Паттерн полос после центрифугирования в градиенте сахарозы, 150000 x g в течение 2 часов
Ультрацентрифугирование
150000 x g, 60 мин
Промывка и выделение фракции PMP
Сильное гелеобразование на всех стадиях, в том числе в конечных PMP

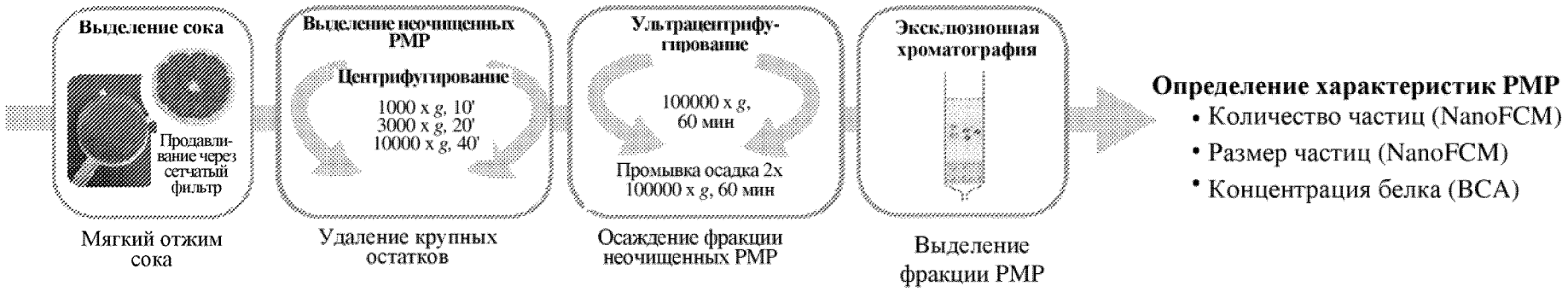
Фиг. 1B


PMP18-2, подвергнутые масштабированию и применению фильтра
9,80E+08 мл-1 +/- (2,33E+07, 2,24E+07) мл-1 (N=2005)
1,88E+07 мл-1 +/- (5,09E+06, 3,13E +06) мл-1 (N=38)
Общая концентрация:
1,00E+09 частиц/мл
N= 2045
Медианный размер:
121,8 нм
Концентрация (частиц мл-1, нм-1)
Диаметр (нм)

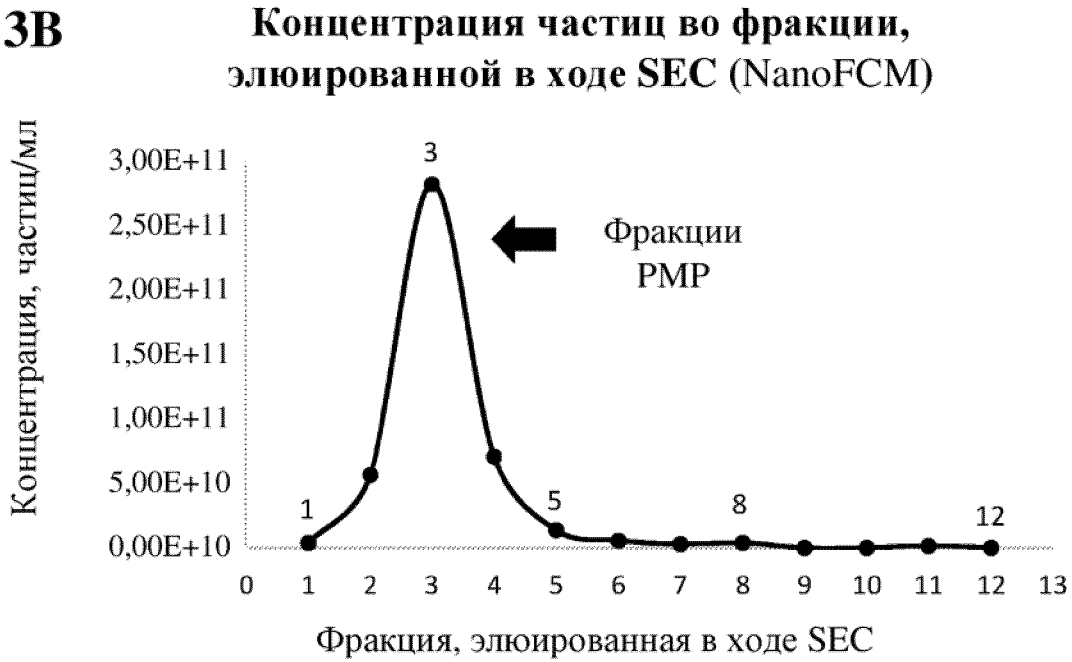
Фиг. 2


Выделение сока
Продавливание через сетчатый фильтр
Мягкий отжим сока
Выделение неочищенных PMP
Центрифугирование
1000 x g, 10'
3000 x g, 20'
10000 x g, 40'
Удаление крупных остатков
Сок после центрифугирования при 1000 x g в течение 10 мин
Ультрацентрифугирование
150000 x g, 90 мин
Осаждение фракции неочищенных PMP
Градиент плотности сахарозы
0%
15%
30%
45%
60%
PMP
150000 x g, 120 мин
Выделение фракции PMP
Паттерн полос после центрифугирования в градиенте сахарозы, 150000 x g в течение 2 часов
Ультрацентрифугирование
150000 x g, 60 мин
Промывка и выделение фракции PMP
Более чистая фракция PMP, меньшая степень гелеобразования

Фиг. 3A

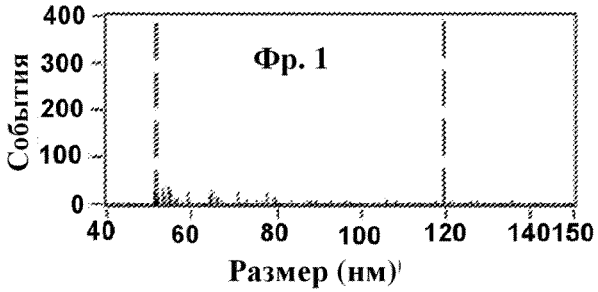

Выделение сока
Продавливание через сетчатый фильтр
Мягкий отжим сока
Выделение неочищенных PMP
Центрифугирование
1000 x g, 10'
3000 x g, 20'
10000 x g, 40'
Удаление крупных остатков
Ультрацентрифугирование
100000 x g, 60 мин
Промывка осадка 2x
100000 x g, 60 мин
Осаждение фракции неочищенных PMP
Эксклюзионная хроматография
Выделение фракции PMP
Определение характеристик PMP
• Количество частиц (NanoFCM)
• Размер частиц (NanoFCM)
• Концентрация белка (BCA)

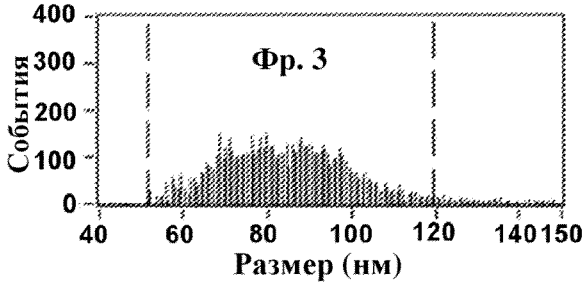
Фиг. 3B

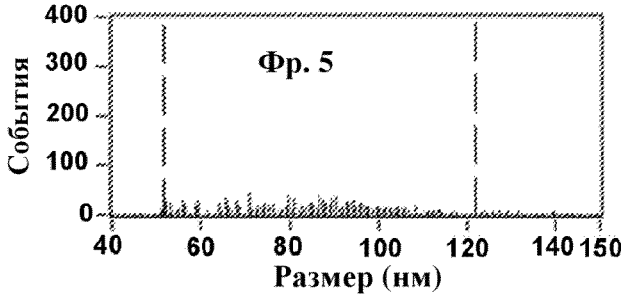

Концентрация частиц во фракции, элюированной в ходе SEC (NanoFCM)
Концентрация, частиц/мл
3,00E+11
2,50E+11
2,00E+11
1,50E+11
1,00E+11
5,00E+10
0,00E+10
Фракции PMP
1
3
5
8
12
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
Фракция, элюированная в ходе SEC

Фиг. 3C

Распределение частиц по размеру и средний размер частиц (нм) в одной фракции, полученной в ходе SEC
(NanoFCM)

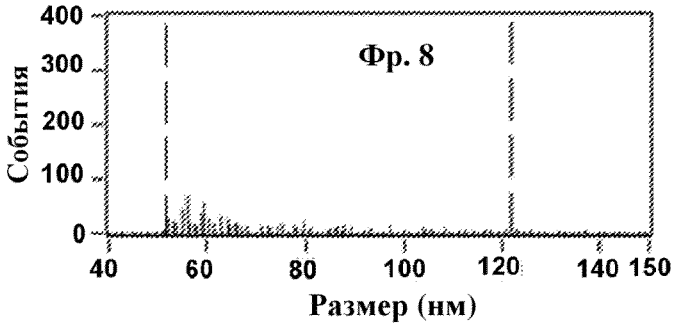




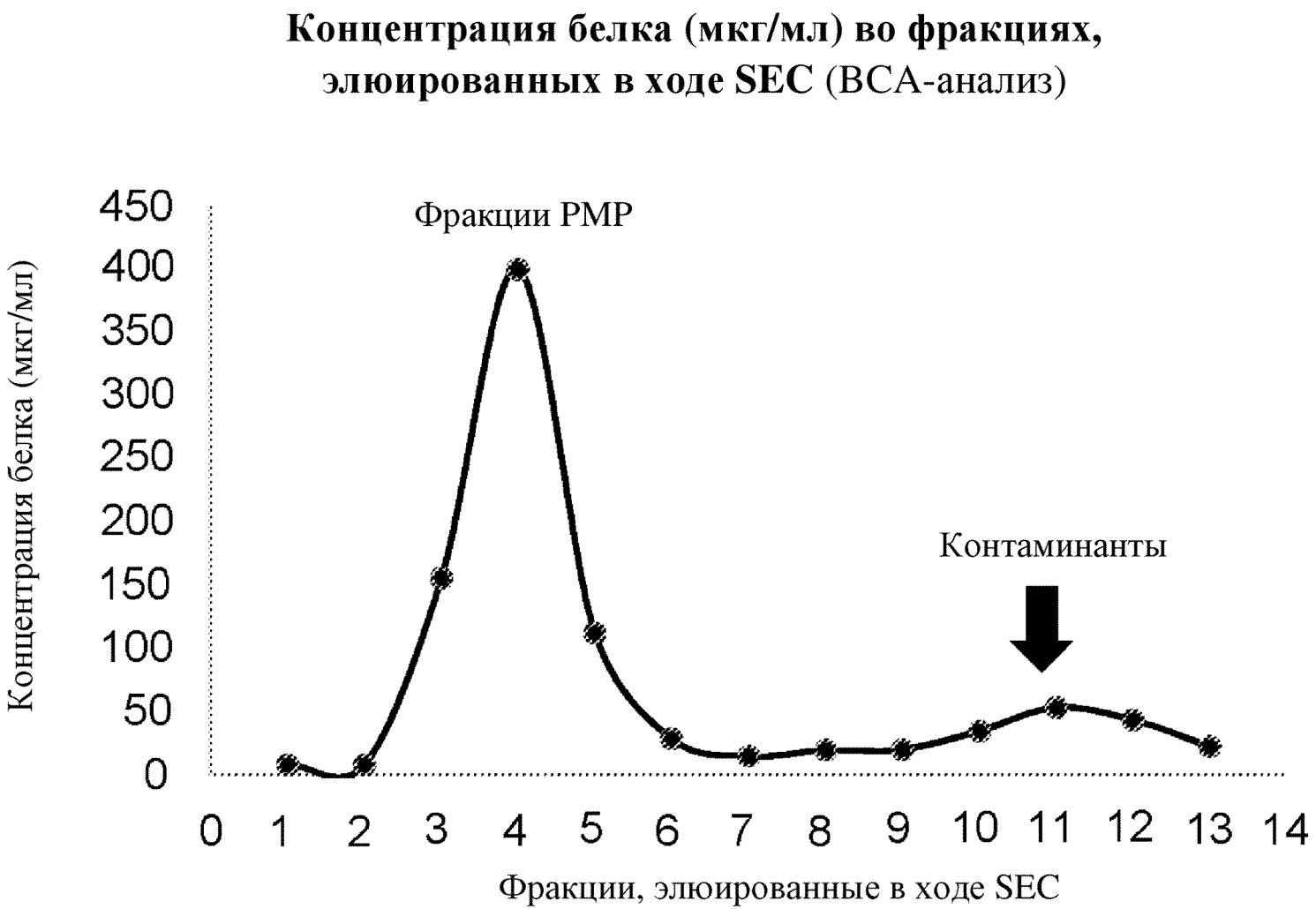


Фракция, полученная в ходе SEC	Медианный размер частиц (нм)	SD	% гейтированных (50-120 нм)
Фр. 1	60,5	11	4,9
Фр. 3	**83,6**	**14,2**	**57,2**
Фр. 5	71,3	15,7	18,1
Фр. 8	69	16,8	13

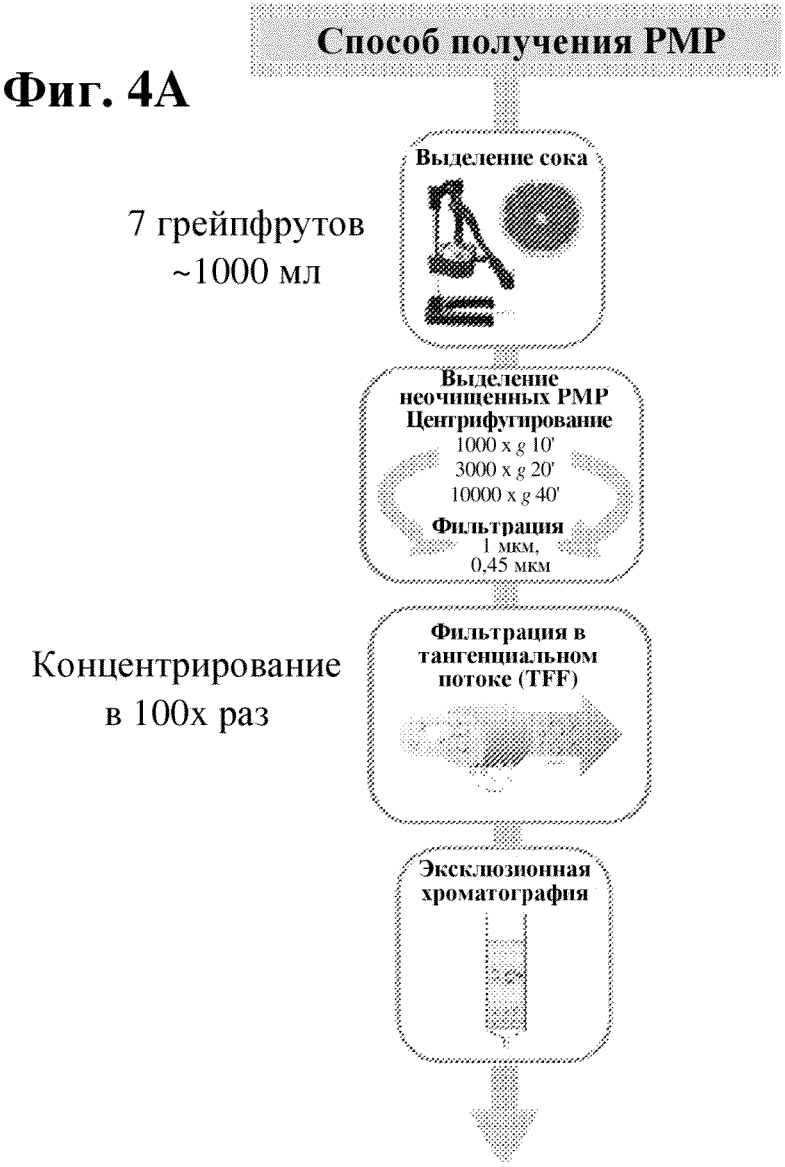
Основная фракция PMP



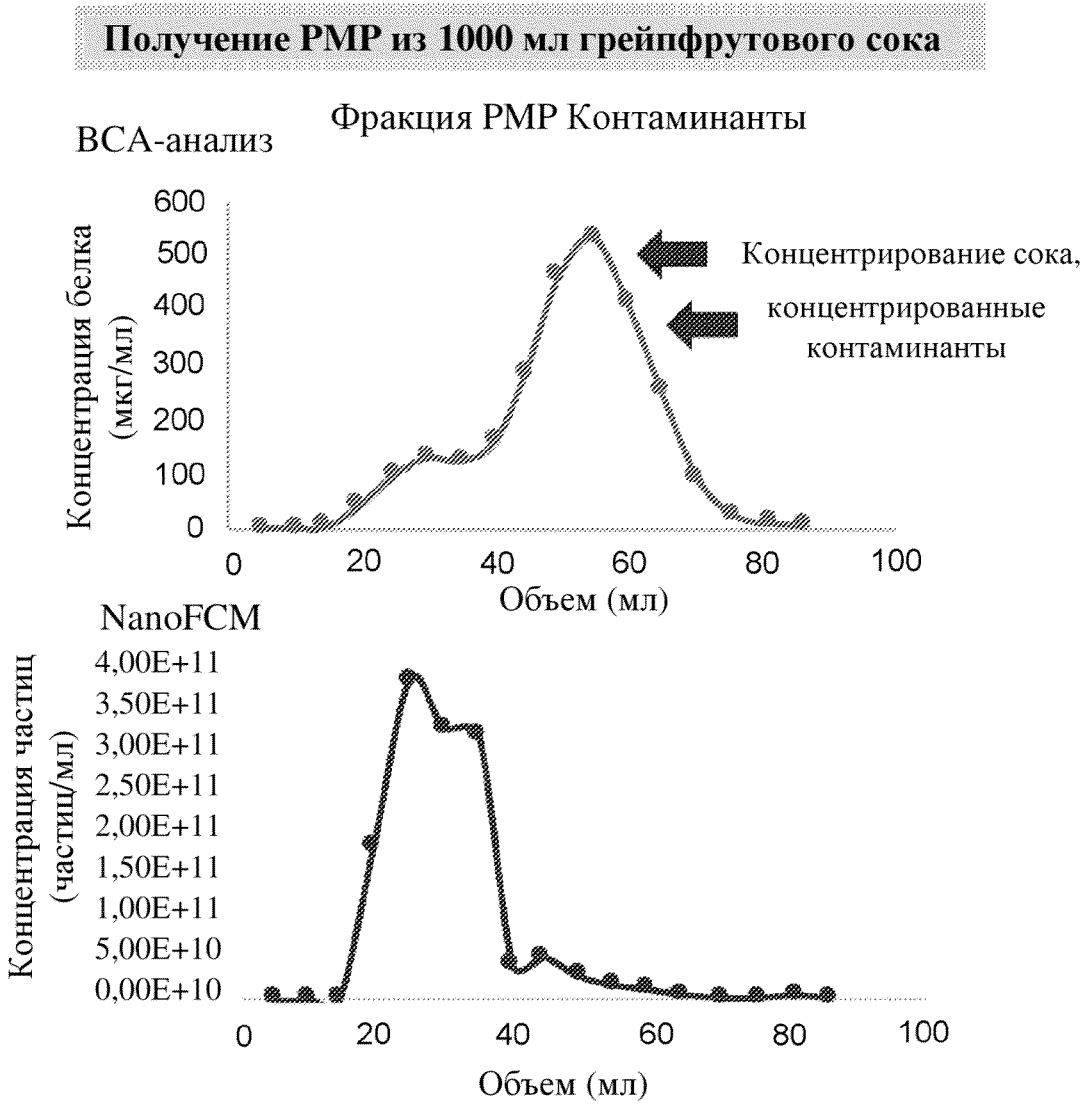
Фиг. 3D


Концентрация белка (мкг/мл) во фракциях, элюированных в ходе SEC (BCA-анализ)
Концентрация белка (мкг/мл)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Фракции PMP
Контаминанты
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Фракции, элюированные в ходе SEC

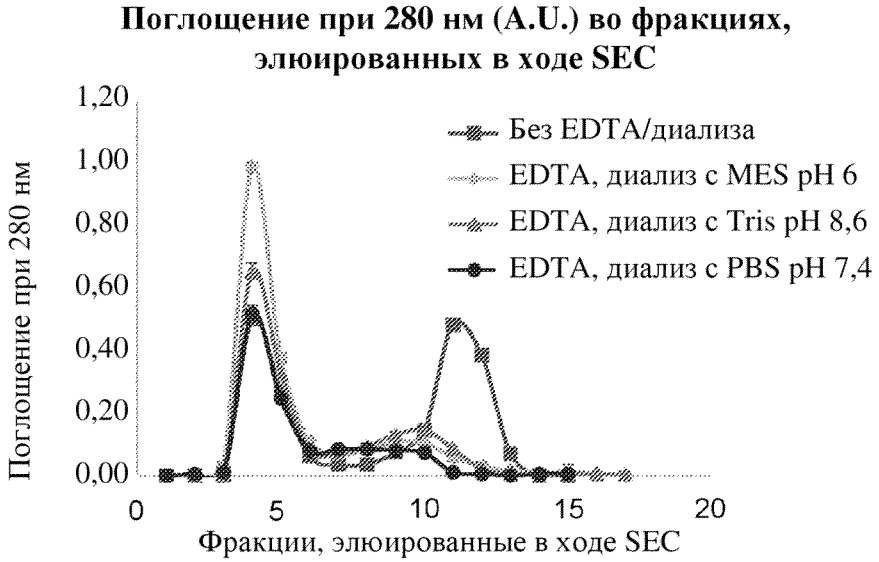
Фиг. 4A


Способ получения PMP
Выделение сока
7 грейпфрутов
~1000 мл
Выделение неочищенных PMP
Центрифугирование
1000 x g 10'
3000 x g 20'
10000 x g 40'
Фильтрация
1 мкм,
0,45 мкм
Концентрирование
в 100х раз
Фильтрация в тангенциальном потоке (TFF)
Эксклюзионная хроматография

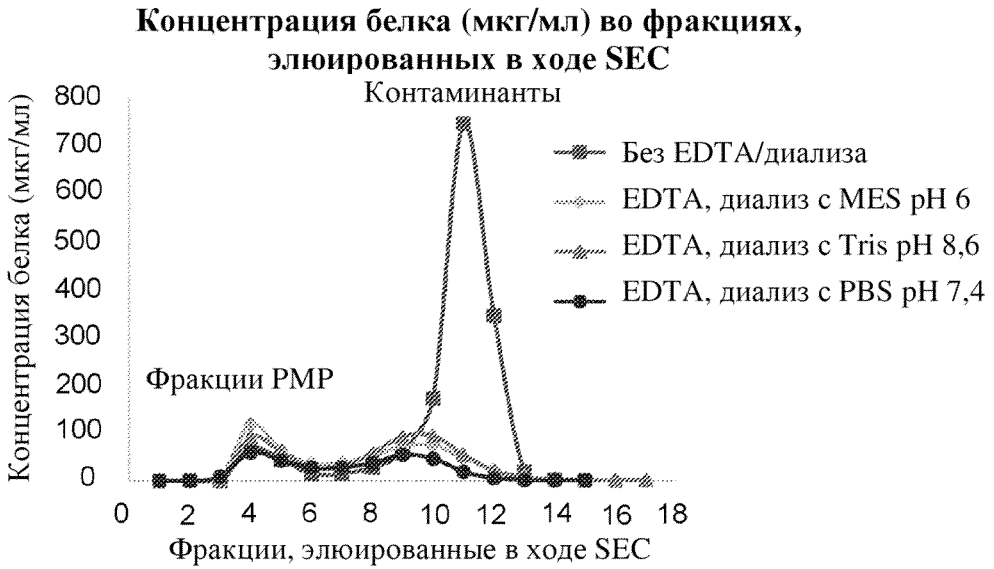
Фиг. 4B


Получение PMP из 1000 мл грейпфрутового сока
BCA-анализ
Фракция PMP Контаминанты
Концентрация белка (мкг/мл)
600
500
400
300
200
100
0
0
20
40
60
80
100
Объем (мл)
Концентрирование сока,
концентрированные контаминанты
NanoFCM
Концентрация частиц (частиц/мл)
4,00E+11
3,50E+11
3,00E+11
2,50E+11
2,00E+11
1,50E+11
1,00E+11
5,00E+10
0,00E+10
0
20
40
60
80
100
Объем (мл)

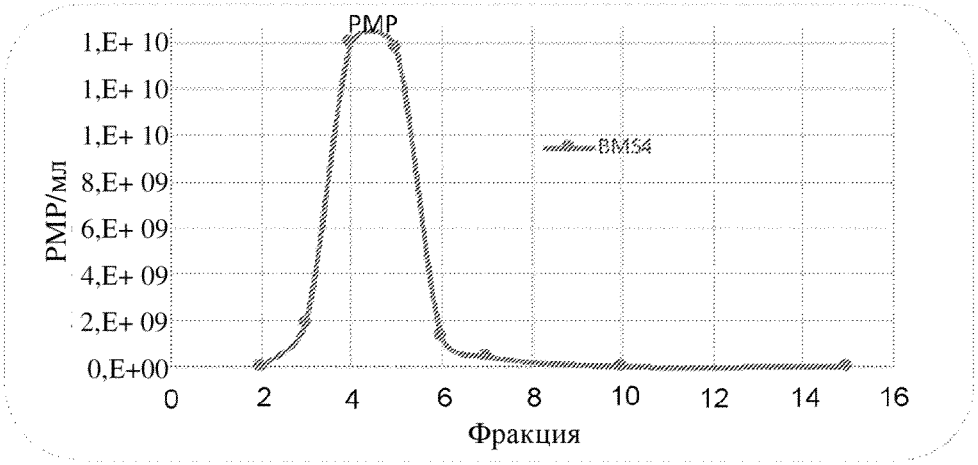
Фиг. 4C


Поглощение при 280 нм (A.U.) во фракциях, элюированных в ходе SEC
Поглощение при 280 нм
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
0
5
10
15
20
Фракции, элюированные в ходе SEC
Без EDTA/диализа
EDTA, диализ с MES pH 6
EDTA, диализ с Tris pH 8,6
EDTA, диализ с PBS pH 7,4

Фиг. 4D

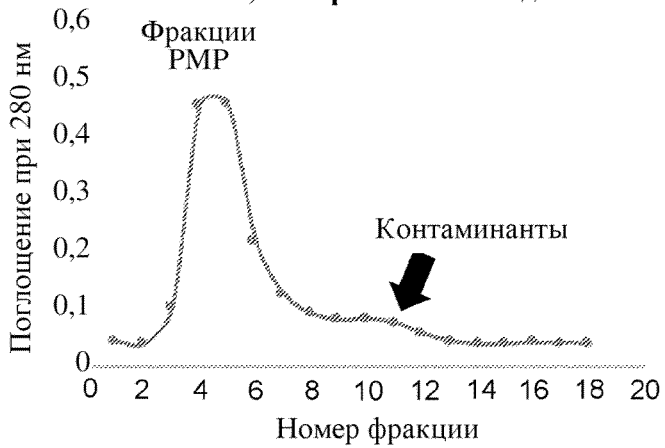

Концентрация белка (мкг/мл) во фракциях, элюированных в ходе SEC
Концентрация белка (мкг/мл)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Контаминанты
Фракции PMP
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
Фракции, элюированные в ходе SEC
Без EDTA/диализа
EDTA, диализ с MES pH 6
EDTA, диализ с Tris pH 8,6
EDTA, диализ с PBS pH 7,4

Фиг. 5A **Концентрация частиц во фракциях из BMS, элюированных в ходе SEC (частиц/мл)**



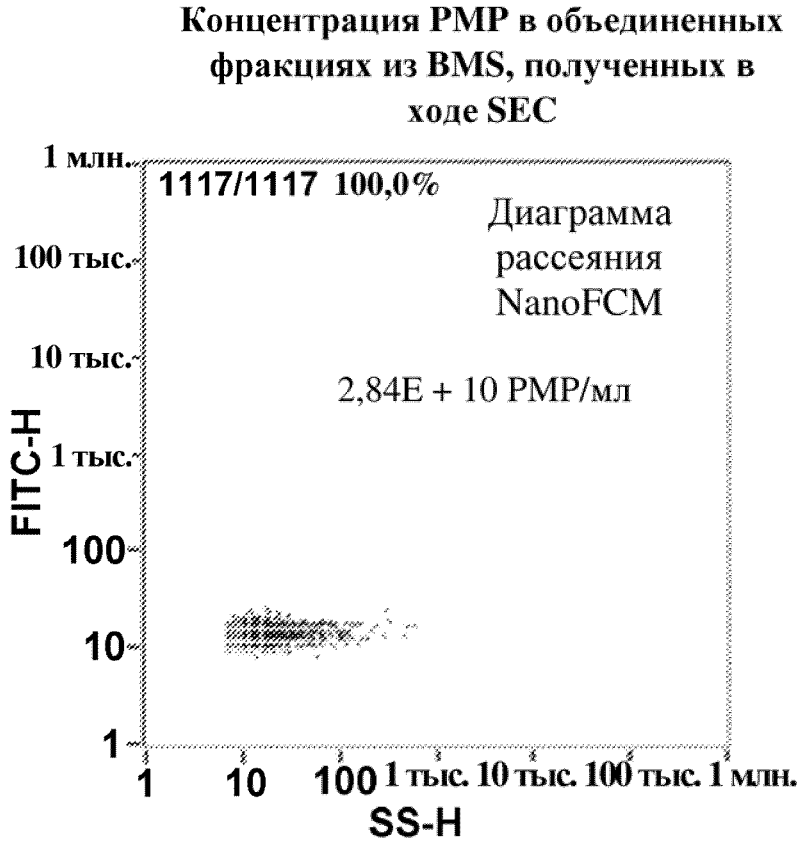
Фиг. 5B

Поглощение при 280 нм (A.U.) во фракциях из BMS, элюированных в ходе SEC

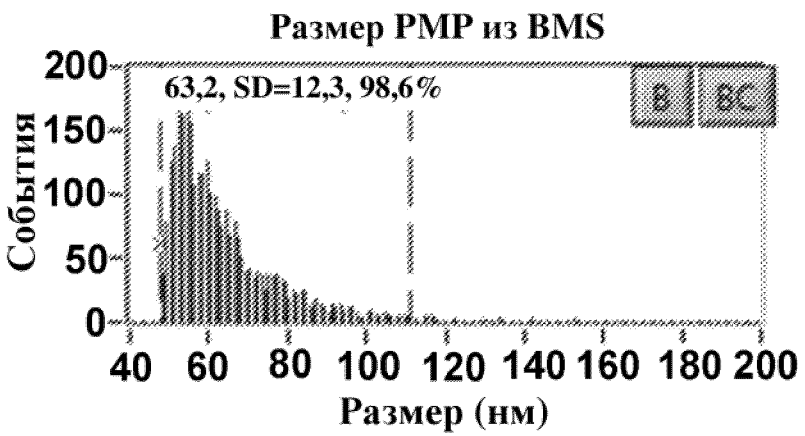


Фиг. 5C **Концентрация белка (мкг/мл) во фракциях из BMS, элюированных в ходе SEC**

Фиг. 5D

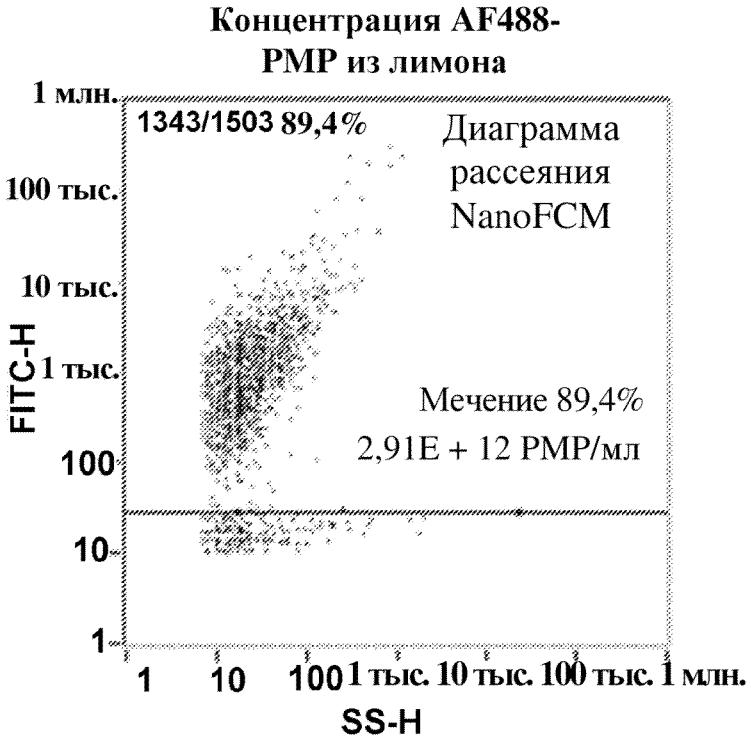


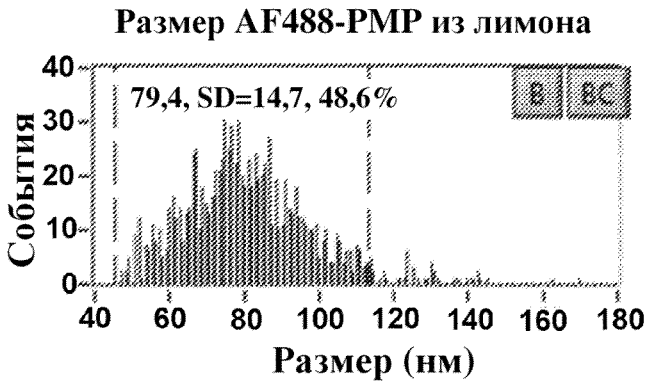
Фиг. 5E



Медианный размер: 63,2 нм +/- 12,3 нм SD

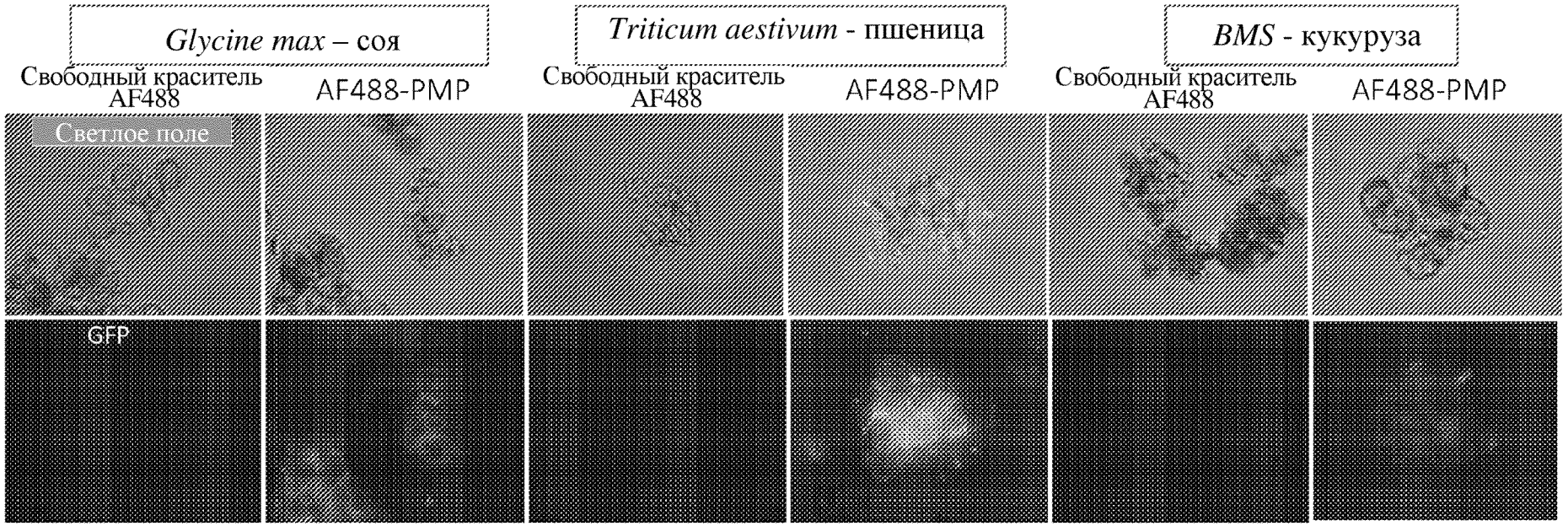
Фиг. 6A





Медианный размер: 79,4 нм +/- 14,7 нм

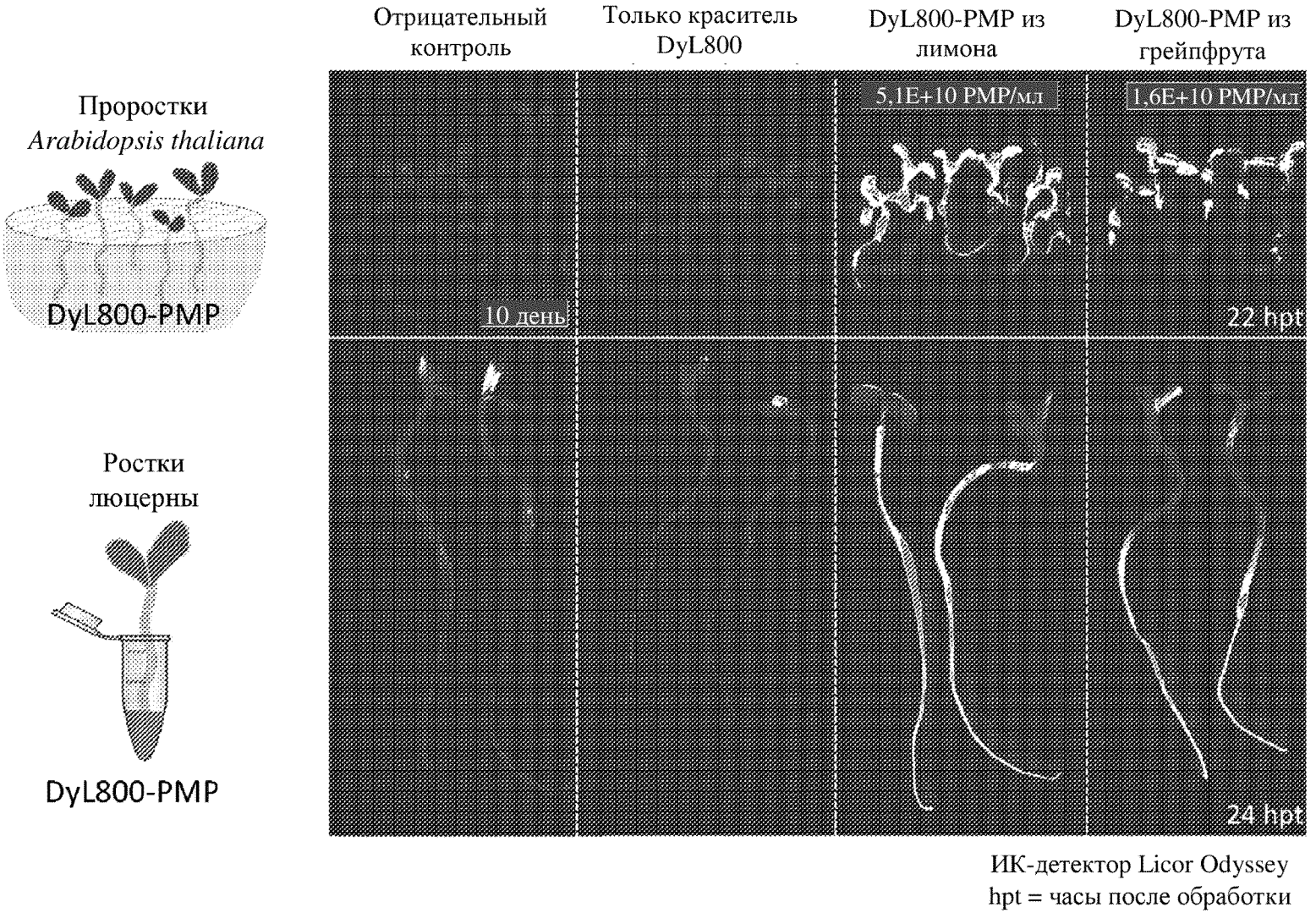
Фиг. 6B



1E + 12 AF488-PMP/мл (лимон)

Evos FL Auto2, 40x

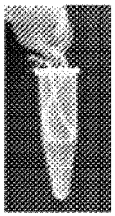
Фиг. 7



ИК-детектор Licor Odyssey
hpt = часы после обработки

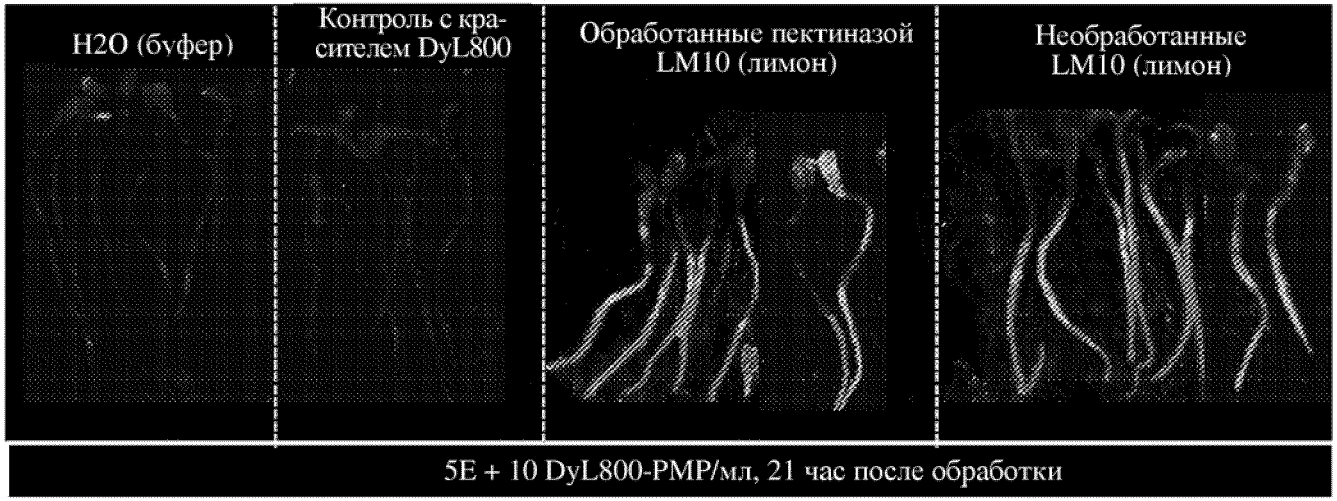
Фиг. 8A

Условия эксперимента:



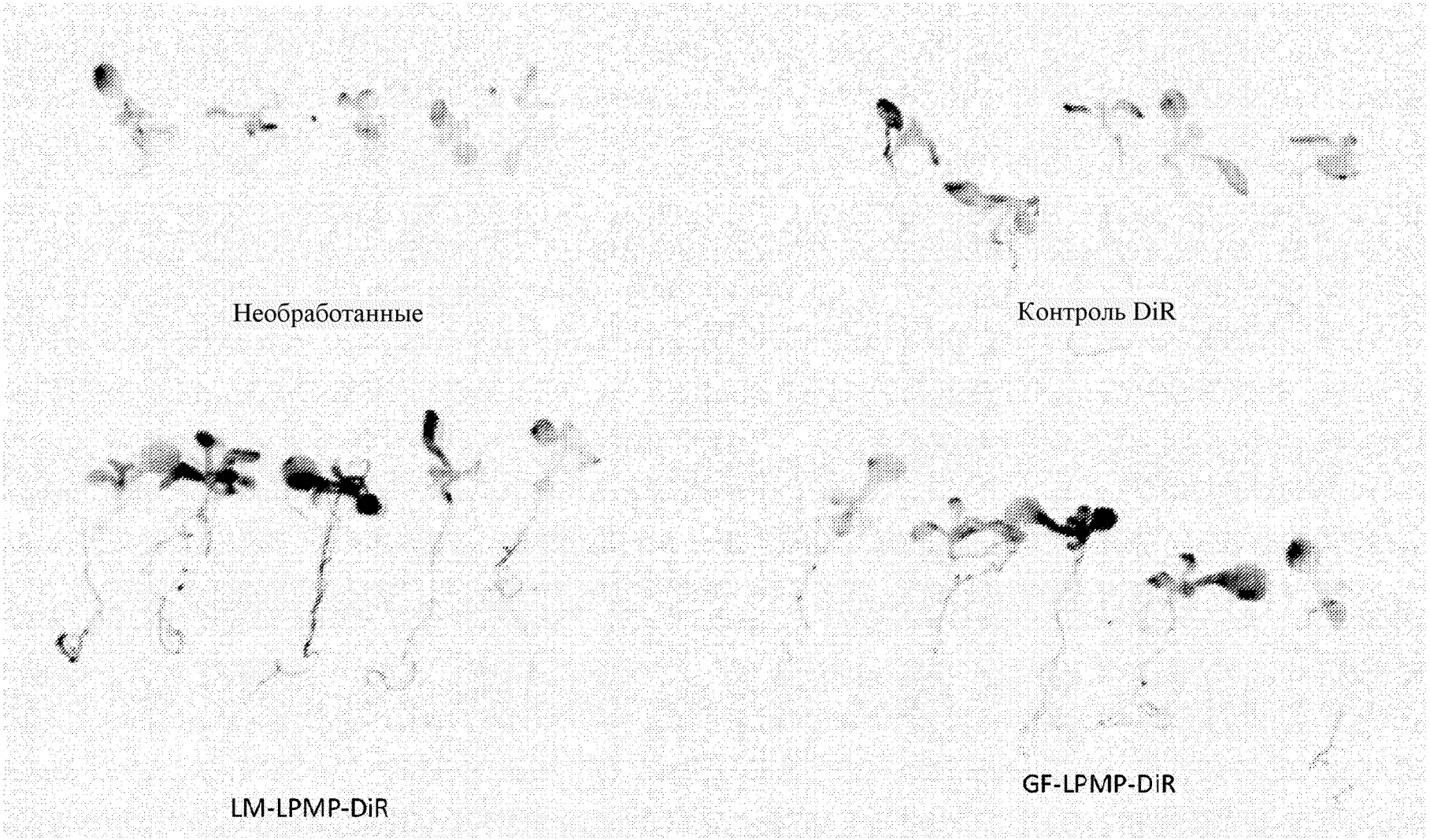
- 2 ростка люцерны/повтор
- 0,5 мл + 5E10 DyL800-PMP/мл
- 21-часовая инкубация
- Промывки
- Визуализация на инфракрасном сканере Odyssey

Фиг. 8B

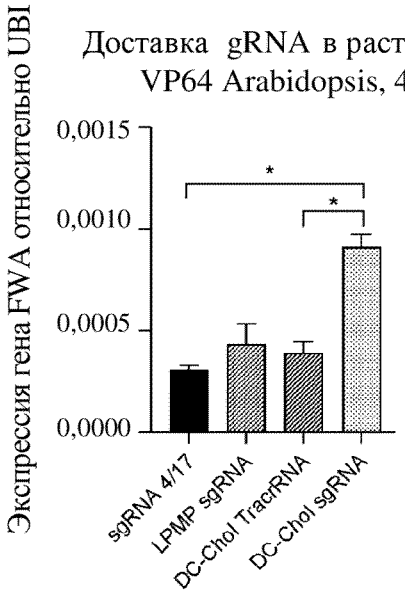


Фиг. 9A

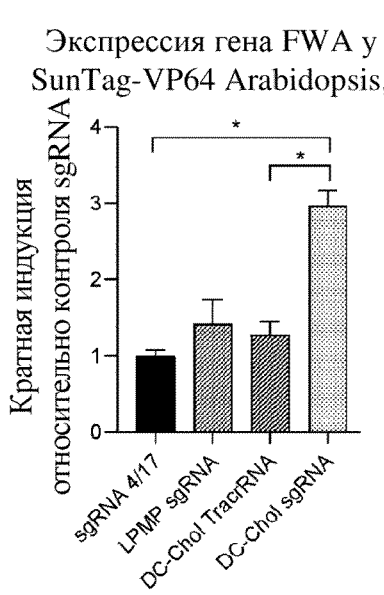
Фиг. 9B



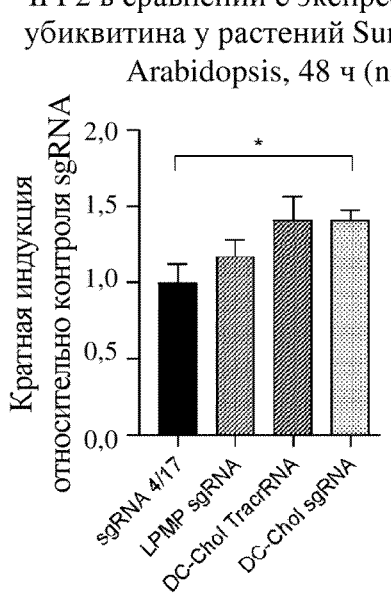
Фиг. 10A



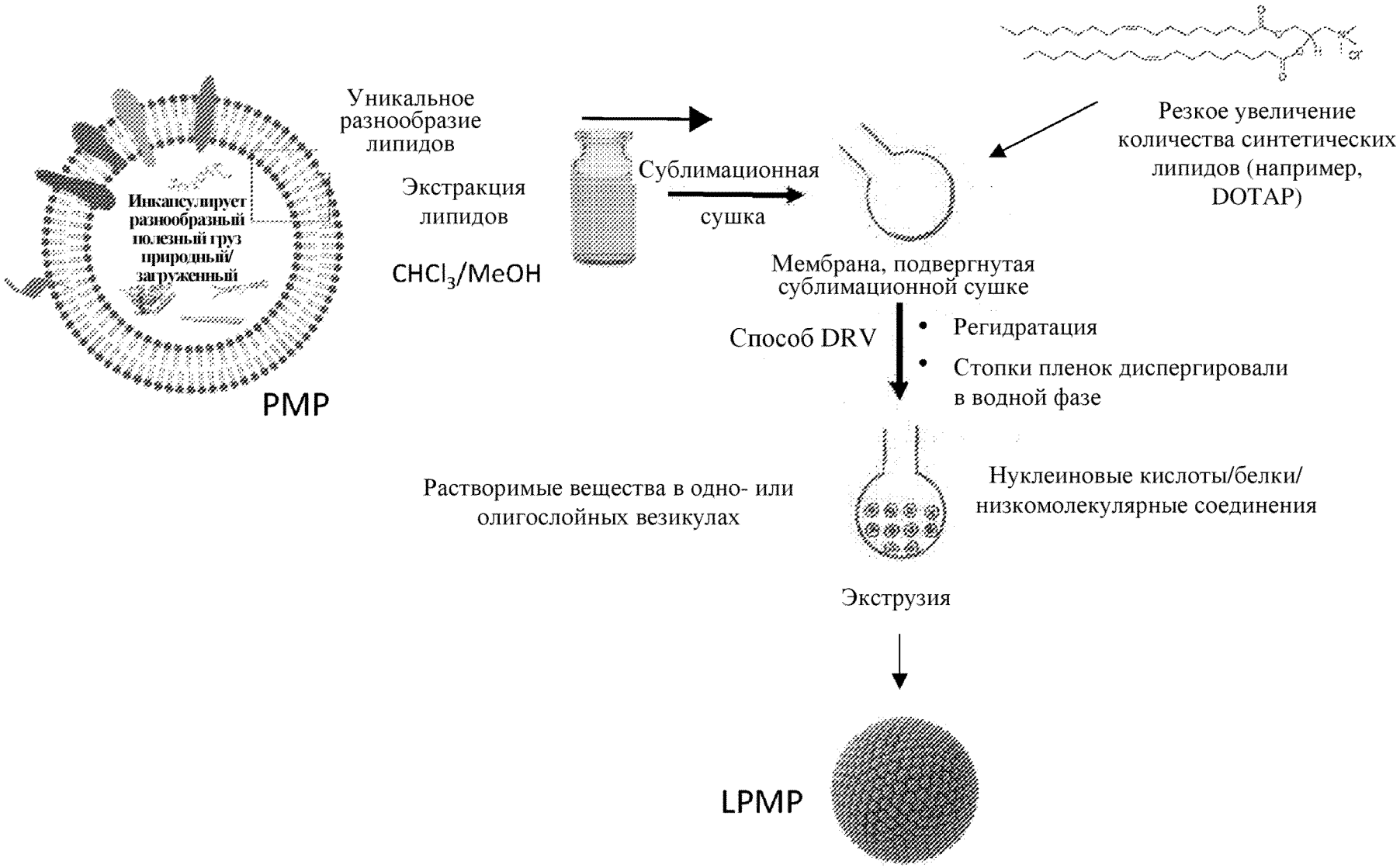
Фиг. 10B



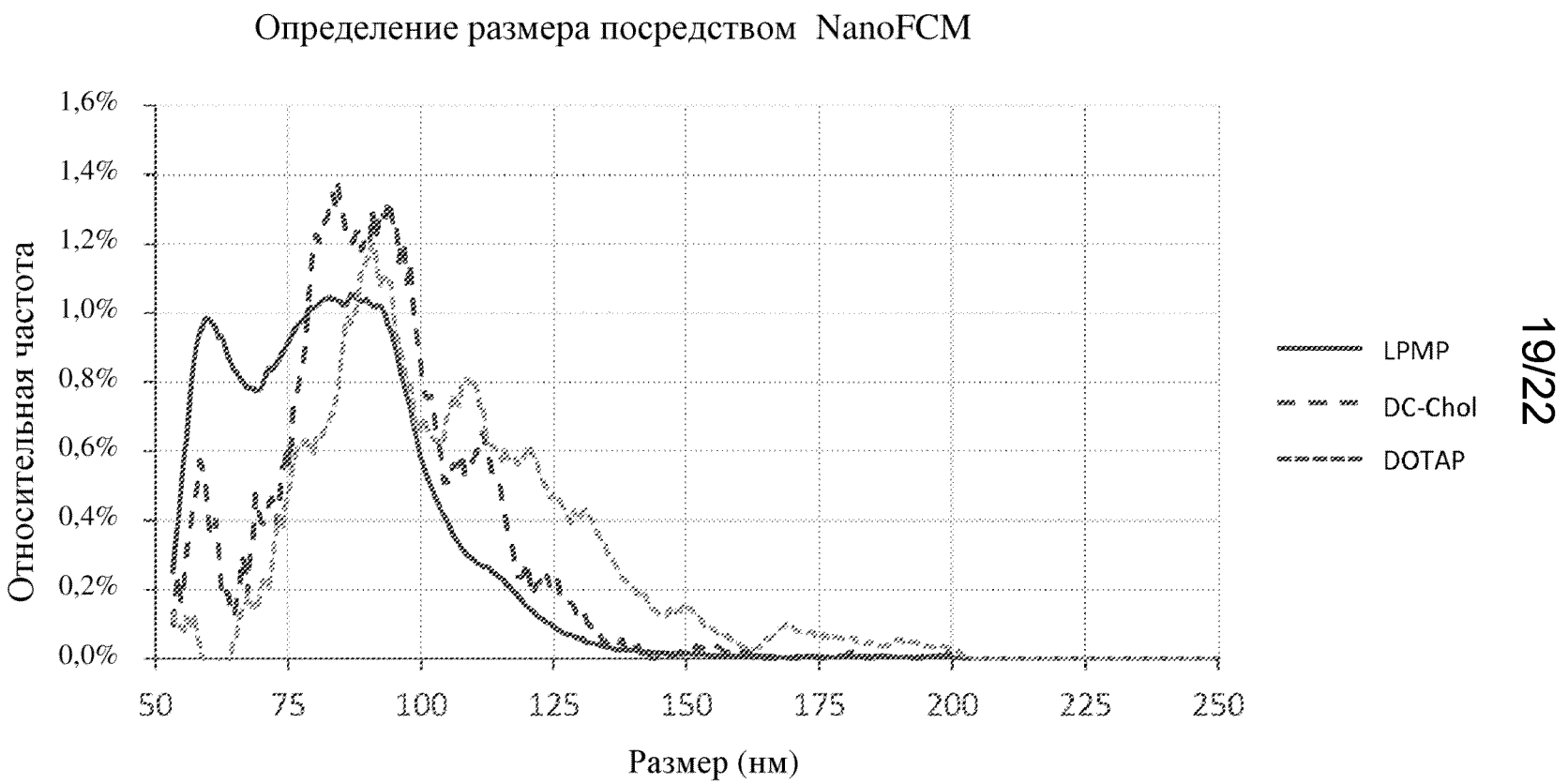
Фиг. 10C



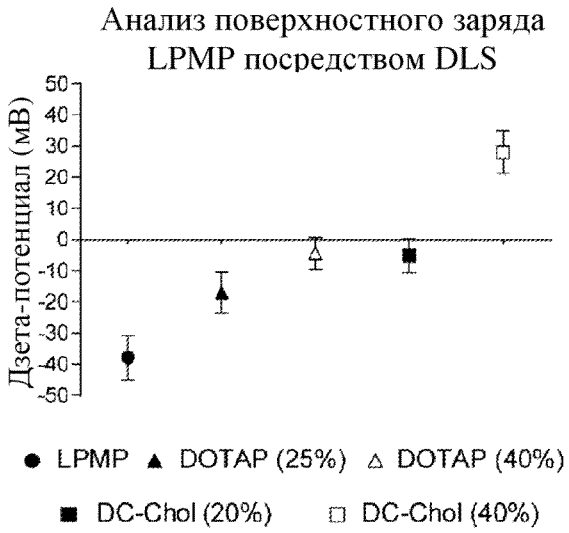
Фиг. 11


Инкапсулирует разнообразный полезный груз природный/ загруженный
PMP
Уникальное разнообразие липидов
Экстракция липидов
CHCl3/MeOH
Сублимационная сушка
Резкое увеличение количества синтетических липидов (например, DOTAP)
Мембрана, подвергнутая сублимационной сушке
Способ DRV
Регидратация
Стопки пленок диспергировали в водной фазе
Растворимые вещества в одно- или олигослойных везикулах
Нуклеиновые кислоты/белки/ низкомолекулярные соединения
Экструзия
LPMP

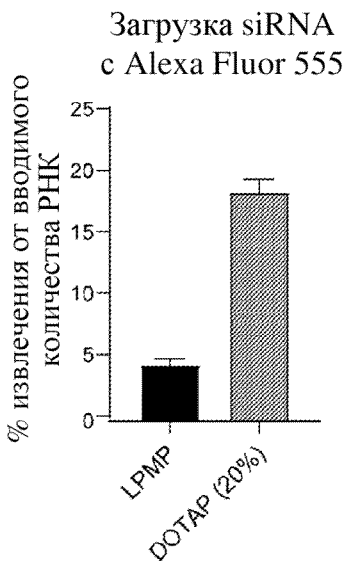
Фиг. 12


Определение размера посредством NanoFCM
Относительная частота
1,6%
1,4%
1,2%
1,0%
0,8%
0,6%
0,4%
0,2%
0,0%
50
75
100
125
150
175
200
225
250
Размер (нм)
LPMP
DC-Chol
DOTAP

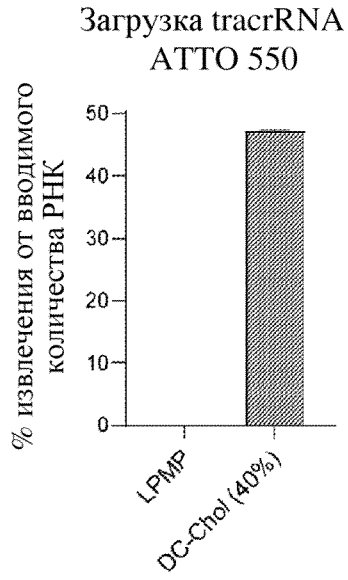
Фиг. 13A



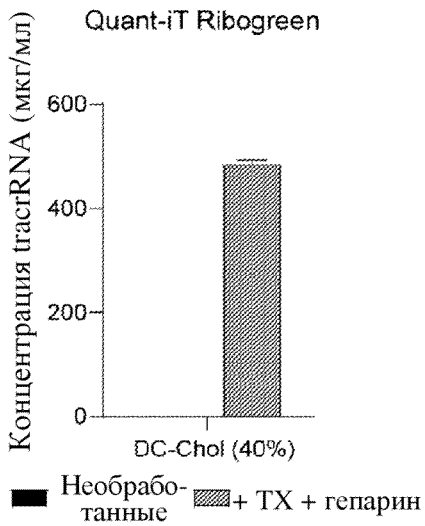
Фиг. 13B



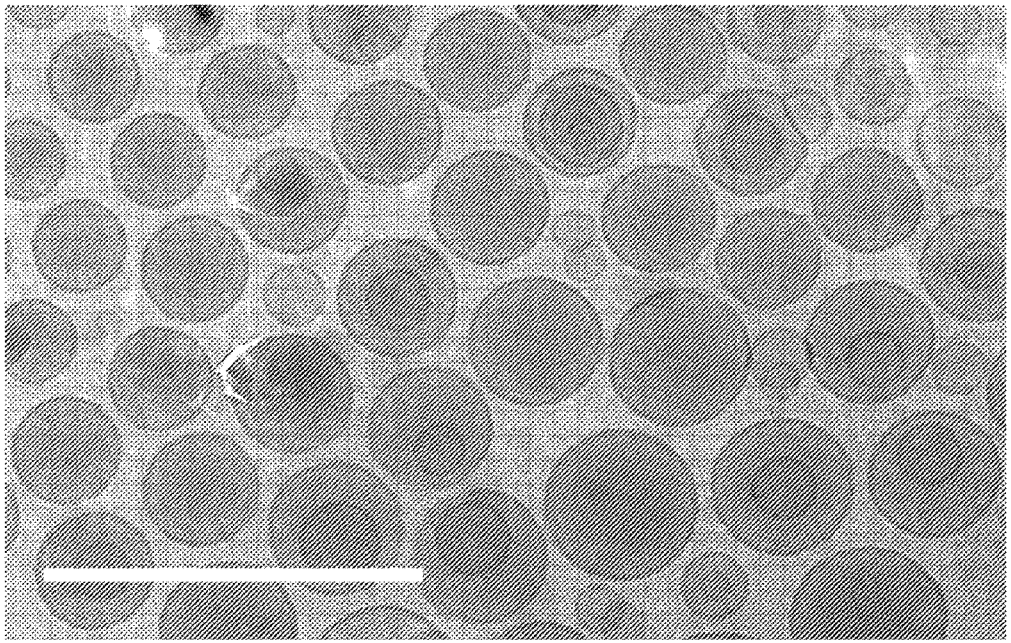
Фиг. 13C



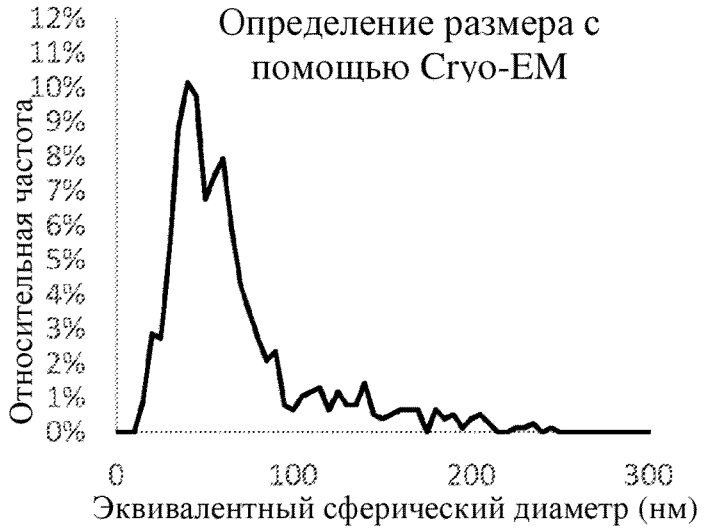
Фиг. 13D



Фиг. 14A



Фиг. 14B



Фиг. 15

Фазовый контраст
TracrRNA ATTO 555
Совмещение
Необработанные (H_2O)
LPMP
DC-Chol