

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039511**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.04

(51) Int. Cl. *C12N 15/89* (2006.01)
C12N 15/84 (2006.01)

(21) Номер заявки
201791681

(22) Дата подачи заявки
2016.01.27

(54) **СПОСОБ САЙТ-НАПРАВЛЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ ЦЕЛОГО РАСТЕНИЯ
ПОСРЕДСТВОМ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА**

(31) **201510040078.0**

(32) **2015.01.27**

(33) **CN**

(43) **2018.03.30**

(86) **PCT/CN2016/072352**

(87) **WO 2016/119703 2016.08.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ИНСТИТУТ ОФ ДЖЕНЕТИКС
ЭНД ДЕВЕЛОПМЕНТАЛ
БАЙОЛОДЖИ, ЧАЙНИЗ АКЭДЕМИ
ОФ САЙЕНСИЗ (CN)**

(72) Изобретатель:

**Гао Каиксиа, Жанг Йи, Ву Жонгуи,
Жанг Кэнг (CN)**

(74) Представитель:

**Вашук Т.В., Емельянова В.А.,
Королева С.В., Кудашов В.И. (BY)**

(56) VOYTAS, D.F. et al. "Precision Genome Engineering and Agriculture: Opportunities and Regulatory Challenges", PLOS biology, vol. 12, no. 6, 10 June 2014 (10.06.2014), DOI: 10.1371/journal.pbio.1001877, pages 1-6, see page 4, Box 2 and page 2, column left, paragraph 2 for details
JIANG, Wenzhi; "Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing in Arabidopsis thaliana and Inheritance of Modified Genes in the T2 and T3 Generations" PLOS ONE, vol. 9, no. 6, 11 June 2014 (11.06.2014), DOI: 10.1371/journal.pone.0099225, pages 1-10, see abstract, and page 1, column right, paragraph 2 for details

LIANG, Zhen et al. "Targeted Mutagenesis in zea mays Using TALENs and the CRISPR/Cas System" Journal of Genetics and Genomics, vol. 41, no. 2, 20 February 2014 (20.02.2014), ISSN: 1673-8527, pages 63-68, see page 67, column left, paragraph 3, and SUPPLEMENTARY DATA Table S1 and Table S2 for details

SHAN, Qiwei et al. "Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system" nature protocols, vol. 9, no. 10, 18 September 2014 (18.09.2014), DOI:10.1038/nprot.2014.157, pages 2395-2410, see page 2397, column left, paragraph 1 for details

WO-A1-2014194190

CN-A-103555711

(57) Изобретение обеспечивает способ сайт-направленной модификации целого растения посредством транзientной экспрессии гена. Данный метод сайт-направленной модификации целевого фрагмента гена-мишени в целом растении состоит из следующих этапов: транзientной экспрессии последовательность-специфической нуклеазы в растении, характеризующейся тем, что в качестве объекта для транзientной экспрессии используется целое растение, таргетирования и расщепления целевого фрагмента, при этом сайт-направленная модификация достигается посредством саморепарации ДНК растения. В соответствии с настоящим изобретением исключается процесс культуры тканей за счет транзientной экспрессии последовательность-специфической нуклеазы; получаемая мутация происходит на уровне целого растения; метод не зависит от генотипа растения или растения-реципиента и может применяться в отношении растений различных сортов и различных видов; мутанты T1 получают напрямую, и мутация стабильно наследуется; более того, получаемое мутантное растение свободно от экзогенных генов и, таким образом, обладает более высокой биобезопасностью.

B1**039511****039511****B1**

Область техники

Изобретение относится к области генетической инженерии растений и касается способа сайт-направленной модификации целого растения посредством транзientной экспрессии гена.

Предпосылки создания изобретения

Трансгенез - это процесс переноса экзогенного гена(ов) в конкретный организм с помощью механизмов молекулярной биологии с целью частичного изменения биологической характеристики или функций организма. В 1983 г. впервые в мире в США было получено трансгенное растение - трансгенное растение табака с антивирусной устойчивостью. В 1986 г. в США был создан трансгенный хлопчатник, устойчивый к вирусам, и проведены полевые испытания с трансгенным хлопчатником. В 1987 г. в культурные растения были введены гены устойчивости к насекомым-вредителям и гербицидам. В 1992 г. трансгенное растение табака было получено в Китае. В 1995 г. Канада начала коммерческую реализацию трансгенных гербицидоустойчивых растений Brassica. В 1996 г. в США началось массовое выращивание хлопчатника, устойчивого к насекомым-вредителям, и сои, устойчивой к гербицидам. В настоящее время в мире существует более 120 трансгенных растений, из которых 51 - соя, хлопчатник и кукуруза - предназначены для коммерческого использования.

Сегодня распространение трансгенных продуктов вызывает все большее беспокойство. Особое беспокойство вызывает генетически модифицированные продукты питания. В большинстве стран регулирование использования трансгенных организмов является весьма жестким. Контроль за трансгенными технологиями и продуктами требует много времени и больших денежных средств. Исследования международной ассоциации CropLife International показали, что на коммерциализацию трансгенного события требуется 5,5 лет и 35 миллионов долларов США. Кроме того, уже доступные коммерческие трансгенные культуры не пользуются большой популярностью на рынке. Например, первые трансгенные томаты были сняты с рынка из-за крайне низких продаж. Поэтому важно разработать нетрансгенные способы улучшения культурных растений.

Существующие способы генетического улучшения культурных растений или модификации генов обладают многочисленными недостатками. Например, традиционное перекрестное скрещивание необходимо проводить на протяжении нескольких поколений, что требует больших затрат труда и времени. Оно может также ограничиваться межвидовой репродуктивной изоляцией и нарушаться нежелательными генными взаимодействиями. Способы физического или химического мутагенеза, такие как радиационный мутагенез, EMS мутагенез и т.д., могут приводить к случайному введению большого количества мутантных сайтов в геном, и идентификация таких мутантных сайтов чрезвычайно затруднена.

Появившиеся в последние годы новейшие технологии, которые используются в качестве инструментов для сайт-направленной модификации геномов, включают, в основном, три категории последовательность-специфических нуклеаз (SSN): нуклеазы цинковые пальцы (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN) и короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированные системы (CRISPR/Cas9). Их общим признаком является то, что они могут действовать в качестве эндонуклеазы для расщепления ДНК в специфических участках последовательностей с образованием в ДНК двухцепочечных разрывов (DSB). DSB способны активировать внутренние механизмы репарации клеток -негомologичное соединение концов (NHEJ) и гомологичную рекомбинацию (HR) - для репарации повреждений ДНК. В ходе процесса репарации ДНК может достигаться сайт-направленная модификация в отношении последовательности ДНК.

Использование технологий переноса генов для доставки вышеуказанных инструментов в культурные растения может способствовать преодолению таких недостатков традиционного скрещивания, как низкая эффективность, временные затраты и плохая специфичность. Этот процесс происходит, однако, с участием трансгенов и чтобы получить сайт-направленный модифицированный мутант, свободный от трансгенов, необходимо осуществить сегрегацию в поколении потомков. Поскольку экзогенные гены интегрируются в геном растения (хотя затем и удаляются путем сегрегации), обеспокоенности, касающиеся безопасности, продолжают существовать. Таким образом, все еще есть необходимость в способе сайт-направленной модификации культурных растений без участия трансгенов.

Осуществление традиционных способов переноса генов, таких как трансформация бомбардировкой частицами, Agrobacterium-опосредованная трансформация или трансформация протопластов, требует культуры тканей. Культура тканей растений означает, что желаемые ткани, клетки или протопласты изолируют из растений и культивируют в искусственных условиях для регенерации целого растения. При культивировании тканей могут происходить соматические мутации. Культура тканей также ограничивается генотипом растения и конкретным растением-реципиентом. Получение регенерированного растения требует больших затрат времени и значительных денежных средств. Трансформация *in situ* - это трансформация живого растения (не *ex vivo*) без необходимости культуры тканей или клеток. При трансформации *in situ* в качестве объекта для трансформации обычно используется целое растение. Такая трансформация включает, например, трансформацию с использованием прорастающих пыльцевых трубок, трансформацию методом погружения соцветий, регенерации стеблевых апексов, инъекции в оплодотворенную завязь, трансформацию листовых дисков и т.п. Способы трансформации *in situ* исключают процесс культуры тканей, и поэтому они просты в осуществлении и не требуют специального оборудования.

Эти способы не зависят от генотипа растения и растения-реципиента и, следовательно, могут применяться в отношении растений различных сортов и различных видов. Более того, трансгенное потомство можно получать напрямую. Таким образом, сайт-направленная модификация растительного генома может достигаться с помощью системы транзientной экспрессии посредством трансформации *in situ*, что способствует применению технологий редактирования генов в растениях.

Краткое изложение сущности изобретения

Целью изобретения является обеспечение способа сайт-направленной модификации целого растения посредством транзientной экспрессии гена.

Настоящее изобретение обеспечивает способ проведения сайт-направленной модификации целевого фрагмента гена-мишени в растении, который может состоять из следующих этапов: транзientной экспрессии последовательность-специфической нуклеазы в растении интереса, характеризующейся тем, что в качестве объекта для транзientной экспрессии используется целое растение, таргетирования и расщепления целевого фрагмента последовательность-специфической нуклеазой, при этом достигается сайт-направленная модификация посредством саморепарации ДНК растения. Данный способ исключает процесс культуры ткани.

Согласно варианту осуществления данного способа подход для транзientной экспрессии сайт-направленной нуклеазы в растении состоит из следующих этапов:

а) введения последовательность-специфической нуклеазы или генетического материала в растение для экспрессии последовательность-специфической нуклеазы и

б) выращивания растения, получаемого на этапе а), в условиях отсутствия селективного давления, при этом последовательность-специфическая нуклеаза или генетический материал, не интегрировавшийся в растительный геном, деградирует.

Согласно варианту осуществления способа по изобретению указанный генетический материал представляет собой рекомбинантный вектор (например, плазмиду ДНК) или линейный фрагмент ДНК, либо РНК, транскрибированную *in vitro*.

В отсутствие селективного давления защитная система растения ингибирует доступ экзогенного гена и деградирует экзогенный ген, который уже был введен в растение. Таким образом, при выращивании целого растения, обеспечивавшего транзientную экспрессию, экзогенный ген (включая любой фрагмент генетического материала для экспрессии нуклеазы, специфичной в отношении целевого фрагмента) не интегрируется в геном растения, и получаемое в результате растение представляет собой нетрансгенное растение с сайт-направленной модификацией.

Согласно варианту осуществления способа по изобретению последовательность-специфическая нуклеаза или генетический материал вводится через любую часть растения, пригодную для введения последовательность-специфической нуклеазы или генетического материала, такую как пыльцевая трубка, соцветие, стеблевой апекс, завязь или лист и т.п.

Согласно варианту осуществления настоящего изобретения, если данная часть растения представляет собой пыльцевую трубку, введение осуществляется путем инъекции раствора, содержащего рекомбинантный вектор (такой как плазида ДНК) или линейный фрагмент ДНК, либо РНК, транскрибированную *in vitro*, или раствора, содержащего последовательность-специфическую нуклеазу, в рыльца после опыления, при этом экзогенный генетический материал или последовательность-специфическая нуклеаза вводится в оплодотворенную завязь через пыльцевую трубку, которая развивается во время цветения и оплодотворения (подход с использованием прорастающих пыльцевых трубок).

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, если данная часть растения представляет собой соцветие, введение осуществляется путем погружения соцветия в раствор *Agrobacterium tumefaciens*, несущий рекомбинантный вектор (такой как плазида ДНК) или линейный фрагмент ДНК (подход методом погружения соцветий или цветочных почек).

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, если данная часть растения представляет собой стеблевой апекс, введение осуществляется путем погружения стеблевого апекса в раствор *Agrobacterium tumefaciens*, несущий рекомбинантный вектор (такой как плазида ДНК) или линейный фрагмент ДНК (подход методом регенерации стеблевых апексов).

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, если данная часть растения представляет собой завязь, введение осуществляется путем инъекции раствора, содержащего рекомбинантный вектор (такой как плазида ДНК) или линейный фрагмент ДНК, либо РНК, транскрибированную *in vitro*, или раствора, содержащего последовательность-специфическую нуклеазу, в завязь после опыления (подход способом инъекции в оплодотворенную завязь).

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, если данная часть растения представляет собой завязь, введение осуществляется путем инъекции раствора *Agrobacterium tumefaciens*, несущего рекомбинантный вектор (такой как плазида ДНК) или линейный фрагмент ДНК, в завязь после опыления (подход способом инъекции *Agrobacterium* в оплодотворенную завязь).

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, если данная часть растения представляет собой лист, введение осуществляется путем инъекции раствора *Agrobacterium tumefaciens*, несущего рекомбинантный вектор (такой как плазида ДНК) или линейный фрагмент ДНК, в лист

(подход методом листовых дисков).

В указанном способе последовательность-специфическая нуклеаза, специфичная в отношении целевого фрагмента, может быть любой нуклеазой, с помощью которой возможно осуществление редактирования генома, например, нуклеаза цинковые пальцы (ZFN), эффекторная нуклеаза, подобная активаторам транскрипции (TALENs), нуклеаза CRISPR/Cas9 и т.п.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения "последовательность-специфическая нуклеаза" предпочтительно является нуклеазой CRISPR/Cas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения генетический материал для экспрессии нуклеаз CRISPR/Cas9, специфичных в отношении целевого фрагмента, предпочтительно включает рекомбинантный вектор или фрагмент ДНК для транскрипции направляющей РНК (или два рекомбинантных вектора или фрагмента ДНК для транскрипции сгРНК и тасгРНК, соответственно) и для экспрессии белка Cas9; либо предпочтительно включает рекомбинантный вектор или фрагмент ДНК для транскрипции направляющей РНК (или два рекомбинантных вектора или фрагмента ДНК для транскрипции сгРНК и тасгРНК, соответственно) и рекомбинантный вектор или фрагмент ДНК, либо РНК, для экспрессии белка Cas9; либо предпочтительно включает направляющую РНК (или сгРНК и тасгРНК) и рекомбинантный вектор или фрагмент ДНК, либо РНК, для экспрессии белка Cas9. Направляющая РНК представляет собой РНК палиндромной структуры, образующуюся путем частичного спаривания оснований между сгРНК и тасгРНК, при этом сгРНК содержит фрагмент РНК, способный комплементарно связываться с целевым фрагментом.

Кроме того, в рекомбинантном векторе или фрагменте ДНК для транскрипции направляющей РНК промотором для инициации транскрипции кодирующей нуклеотидной последовательности направляющей РНК является промотор U6 или промотор U3.

Наиболее предпочтительно, рекомбинантный вектор для транскрипции направляющей РНК и экспрессии Cas9 представляет собой рекомбинантную плазмиду, получаемую путем инсерции кодирующей последовательности "фрагмента РНК, способного комплементарно связываться с целевым фрагментом" в направлении вверх по течению между BsaI сайтами рестрикции плазмиды pHSN40 или pHSN401.

Рекомбинантный вектор для транскрипции направляющей РНК представляет собой рекомбинантную плазмиду, получаемую путем инсерции кодирующей последовательности "фрагмента РНК, способного комплементарно связываться с целевым фрагментом" в направлении вверх по течению между BbsI сайтами рестрикции плазмиды pZmU3-gRNA; рекомбинантный вектор для экспрессии нуклеазы Cas9 предпочтительно представляет собой вектор pJIT163-Ubi-Cas9.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения "последовательность-специфической нуклеазой" являются нуклеазы TALENs. Генетический материал для экспрессии последовательность-специфической нуклеазы, специфичной в отношении целевого участка, может представлять собой рекомбинантный вектор (плазмиду ДНК) или фрагмент ДНК, либо РНК, экспрессирующую спаренные белки TALEN, при этом белок TALEN включает ДНК-связывающий домен, способный узнавать и связываться с целевым фрагментом, и домен Fok I.

Если последовательность-специфической нуклеазой являются нуклеазы цинковые пальцы (ZFN), генетическим материалом для экспрессии последовательность-специфической нуклеазы, специфичной в отношении целевого участка, может быть рекомбинантный вектор (плазида ДНК) или фрагмент ДНК, либо РНК, экспрессирующая спаренные белки ZFN, при этом белок ZFN включает ДНК-связывающий домен, способный узнавать и связываться с целевым фрагментом, и домен Fok I.

В способе согласно настоящему изобретению сайт-направленная модификация предпочтительно представляет собой инсерцию, делецию и/или замену в целевом фрагменте растительного генома. Согласно варианту осуществления настоящего изобретения целевой фрагмент располагается внутри кодирующей области гена-мишени.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения целевой участок располагается в области регуляции транскрипции гена-мишени, такой как промотор. Согласно еще одному варианту осуществления изобретения ген-мишень может быть структурным или неструктурным геном. Согласно варианту осуществления настоящего изобретения модификация приводит к утрате функции гена-мишени. Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения модификация приводит к приобретению (или изменению) функции гена-мишени.

Согласно варианту осуществления изобретения растение может быть растением любого генотипа. Растение может быть однодольным или двудольным растением, таким как кукуруза сахарная (*Zea mays*), пшеница, соя, хлопок, табак, *Arabidopsis*, розь, *Rosa roxbunghii*, *Eriobotrya japonica*, *Carica papaya*, *Rosa canina*, *Dendrobium nobile* Lindl., *Brassica oleracea*, *Fagopyrum tataricum* или *Nevea brasiliensis*.

Если растение представляет собой кукурузу, пшеницу, сою, хлопок, табак и т.п., последовательность-специфическая нуклеаза или генетический материал может доставляться с помощью подхода с использованием прорастающих пыльцевых трубок. Если растение представляет собой *Arabidopsis*, пшеницу, розь и т.п., последовательность-специфическая нуклеаза или генетический материал может доставляться с помощью подхода методом погружения соцветий. Если растение представляет собой кукурузу, *Rosa roxbunghii*, *Eriobotrya japonica*, *Carica papaya*, *Rosa canina* и т.п., генетический материал может доставляться с помощью подхода методом регенерации стеблевых апексов. Если растение представляет

собой пшеницу, сою, хлопок, *Dendrobium nobile* Lindl. и т.п., последовательность-специфическая нуклеаза или генетический материал может доставляться с помощью подхода методом инъекции в оплодотворенную завязь. Если растение представляет собой табак, *Brassica oleracea*, *Fagopyrum tataricum*, *Nevea brasiliensis* и т.п., генетический материал может доставляться с помощью подхода методом листовых дисков.

Согласно варианту осуществления настоящего изобретения (пример 1) растение представляет собой растение кукурузы (в частности, гибрид HiII и инбредную линию B73, Zheng58 и т.п.); нуклеаза представляет собой CRISPR/Cas9; ген-мишень представляет собой эндогенный ген *ZmIPK* кукурузы; целевой фрагмент представляет собой 5'-AGCTCGACCACGCCGCCGAC-3'; рекомбинантный вектор для транскрипции направляющей РНК представляет собой рекомбинантную плазмиду, получаемую путем инсерции фрагмента ДНК, как показано в 5'-AGCAGTCGGCGGCGTGGTTCGAGCT-3', в направлении вверх по течению между двумя BbsI сайтами рестрикции плазмиды pZmU3-gRNA; рекомбинантный вектор для экспрессии нуклеазы Cas9 предпочтительно представляет собой вектор pJIT163-Ubi-Cas9; рекомбинантный вектор для транскрипции направляющей РНК и экспрессии белка Cas9 представляет собой рекомбинантную плазмиду, получаемую путем инсерции фрагмента ДНК, как показано в 5'-GGCGGTTCGGCGGCGTGGTTCGAGCT-3', в направлении вверх по течению между двумя BsaI сайтами рестрикции плазмиды pBUE411.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения (пример 2) растение представляет собой *Arabidopsis*; нуклеаза представляет собой CRISPR/Cas9; ген-мишень представляет собой эндогенный ген *AtPTPA* *Arabidopsis*; целевой фрагмент представляет собой 5'-ACGATATCCGCCGATTTACAC-3'; рекомбинантный вектор для транскрипции направляющей РНК и экспрессии белка Cas9 представляет собой рекомбинантную плазмиду, получаемую путем инсерции фрагмента ДНК, как показано в 5'-ATTGGTGAAATCGGCGGATATCGT-S', в направлении вверх по течению между двумя BsaI сайтами рестрикции плазмиды pHSN401.

Объектом настоящего изобретения также является мутантное нетрансгенное растение и/или его потомство, получаемое путем использования способа по изобретению для проведения сайт-направленной модификации целевого фрагмента гена-мишени в растении интереса с целью утраты геном-мишенью своих функций.

Согласно настоящему изобретению также предлагается способ создания мутантного нетрансгенного растения, состоящий из следующих этапов: осуществления сайт-направленной модификации целевого фрагмента гена-мишени в растении интереса путем использования способа по данному изобретению, получения растения, в котором функции гена-мишени утеряны и геном которого свободен от интегрированного экзогенного гена.

В данном случае трансгенное растение касается растения, в геном которого интегрирован экзогенный ген. Нетрансгенное растение касается растения, геном которого не содержит интеграции экзогенного гена.

Настоящее изобретение объединяет технологию редактирования генома и систему транзientной экспрессии, при которой в качестве объекта для экспрессии используется целое растение. Это означает, что в соответствии с настоящим изобретением в клетки или ткани целого растения вводится последовательность-специфическая нуклеаза посредством подходов с использованием прорастающих пыльцевых трубок, погружения соцветий, регенерации стеблевых апексов, инъекций в оплодотворенную завязь, листовых дисков и т.п.; затем достигается модификация растительного генома путем транзientной экспрессии последовательность-специфической нуклеазы. Мутантное потомство, обладающее высокой степенью безопасности, можно получать напрямую. Например, при применении подхода с использованием прорастающих пыльцевых трубок раствор, содержащий последовательность-специфическую нуклеазу или ДНК/РНК для экспрессии последовательность-специфической нуклеазы, доставляется в оплодотворенные яйцеклетки или зародышевые клетки (сперматозоид или яйцеклетка) посредством пыльцевой трубки, формирующейся во время цветения или оплодотворения растения. Эти клетки подобны протопластам (лишены клеточной стенки), ДНК в этих клетках подвергается активной репликации и рекомбинации и, таким образом, эффективно редактируется с помощью последовательность-специфической нуклеазы. Модифицированные оплодотворенные яйцеклетки или зародышевые клетки могут развиваться в интактные мутантные растения. Интродуцированная последовательность-специфическая нуклеаза или РНК, кодирующая последовательность-специфическую нуклеазу, разрушается растительными клетками. ДНК, кодирующая последовательность-специфическую нуклеазу, также разрушается растительными клетками, так как способ осуществляется в отсутствие селективного давления. Таким образом, экзогенный ген не интегрируется в геном, и получаемые в результате мутанты обладают более высокой биобезопасностью.

Преимущества настоящего изобретения заключаются в следующем: отсутствует этап культуры тканей; получаемая мутация происходит на уровне целого растения и, следовательно, может применяться в отношении растений различных сортов и различных видов; мутанты T1 можно получать напрямую, при этом мутации стабильно наследуются; и самое важное - получаемые мутантные растения свободны от экзогенных генов и поэтому обладают более высокой биобезопасностью.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан сайт-направленный мутагенез эндогенного гена ZmIPK кукурузы посредством системы транзientной экспрессии gRNA:Cas9. а) Представляет собой гельэлектрофореграмму. Дорожка 1 - маркер, снизу вверх: 250, 500, 750, 1000 п.о., соответственно; дорожка 2 и дорожка 3 - результаты расщепления нуклеазами рестрикции SacI ПЦР-продуктов ДНК протопластов, где протопласты были трансформированы с использованием системы gRNA:Cas9; дорожка 4 - результат расщепления нуклеазой рестрикции SacI ПЦР-продукта ДНК протопласта дикого типа; дорожка 5 - ПЦР-продукт ДНК протопласта дикого типа. б) Результаты секвенирования некоторых мутантов.

На фиг. 2 показан сайт-направленный мутагенез эндогенного гена ZmIPK кукурузы сорта HiI посредством системы транзientной экспрессии gRNA:Cas9 через подход с использованием прорастающих пыльцевых трубок, а также результаты секвенирования. а) Представляет собой гельэлектрофореграмму. Дорожка 1 - маркер, снизу вверх: 100, 250, 500, 750, 1000 п.о., соответственно; дорожки 2-12 - результаты расщепления нуклеазами рестрикции SacI ПЦР-продуктов мутантов; дорожка 13 - результат расщепления нуклеазой рестрикции SacI ПЦР-продукта контроля дикого типа. б) Результаты секвенирования некоторых мутантов.

На фиг. 3 показан сайт-направленный мутагенез эндогенного гена ZmIPK кукурузы сорта В73 посредством системы транзientной экспрессии gRNA:Cas9 через подход с использованием прорастающих пыльцевых трубок, а также результаты секвенирования. а) Представляет собой гельэлектрофореграмму. Дорожка 1 - маркер, снизу вверх: 100, 250, 500, 750, 1000 п.о., соответственно; дорожки 2-6 - результаты расщепления нуклеазами рестрикции SacI ПЦР-продуктов мутантов; дорожка 7 - результат расщепления нуклеазой рестрикции SacI ПЦР-продукта контроля дикого типа. б) Результаты секвенирования некоторых мутантов.

На фиг. 4 показан сайт-направленный мутагенез эндогенного гена ZmIPK кукурузы сорта Zheng58 посредством системы транзientной экспрессии gRNA:Cas9 через подход с использованием прорастающих пыльцевых трубок, а также результаты секвенирования. а) Представляет собой гельэлектрофореграмму. Дорожка 1 - маркер, снизу вверх: 100, 250, 500, 750, 1000 п.о., соответственно; дорожки 2-9 - результаты расщепления нуклеазами рестрикции SacI ПЦР-продуктов мутантов; дорожка 10 - результат расщепления нуклеазой рестрикции SacI ПЦР-продукта контроля дикого типа. б) Результаты секвенирования некоторых мутантов.

Фиг. 5 представляет собой гельэлектрофореграмму амплификации генов-мутантов ZmIPK различных сортов кукурузы через подход с использованием прорастающих пыльцевых трубок и с участием наборов из 2 праймеров на векторах pZmU3-gRNA-C1 и pJIT163-Ubi-Cas9. а) Результат амплификации с участием пары праймеров ZmU3-F/C1R. б) Результат амплификации с участием пары праймеров Cas9-1F/Cas9-1R. Дорожка 1 - маркер, снизу вверх: 100, 250, 500, 750, 1000 п.о., соответственно; дорожки 2-10 - тестируемые мутанты; дорожка 11 - положительный контроль (плазмида pZmU3-gRNA-C1 или pJIT163-Ubi-Cas9).

На фиг. 6 показан сайт-направленный мутагенез эндогенного гена AtPTPA Arabidopsis посредством системы транзientной экспрессии gRNA:Cas9 в протопластах. а) Представляет собой гельэлектрофореграмму. Дорожка 1 - маркер, снизу вверх: 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 5000 п.о., соответственно; дорожка 2 и дорожка 3 - результаты расщепления нуклеазами рестрикции EcoRV ПЦР-продуктов ДНК протопластов, где протопласты были трансформированы с использованием системы gRNA:Cas9; дорожка 4 - результат расщепления EcoRV ПЦР-продукта ДНК протопласта дикого типа; дорожка 5 - ПЦР-продукт протопласта дикого типа. б) Результаты секвенирования неразрезанных полосок.

На фиг. 7 показан сайт-направленный мутагенез эндогенного гена AtPTPA Arabidopsis посредством системы транзientной экспрессии gRNA:Cas9 через подход погружения соцветий. а) Представляет собой гельэлектрофореграмму. Дорожка 1 - маркер, снизу вверх: 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 5000 п.о., соответственно; дорожка 2-9 - результаты расщепления нуклеазами рестрикции EcoRV ПЦР-продуктов мутантов; дорожка 10 - результат расщепления EcoRV ПЦР-продукта контроля дикого типа. б) Результаты секвенирования некоторых мутантов.

Фиг. 8 представляет собой гельэлектрофореграмму амплификации генов-мутантов AtPTPA с участием праймеров на векторе pHSN401-C2. а) Результат амплификации с участием пары праймеров pHSN401-1F/C2R; б) Результат амплификации с участием пары праймеров CAS9-2F/CAS9-2R. Дорожка 1 - маркер, снизу вверх: 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 5000 п.о., соответственно; дорожки 2-9 - тестируемые мутанты; дорожка 10 - положительный контроль (плазмида pHSN401).

На фиг. 9 представлены мутации в потомках генов-мутантов AtPTPA. Дорожка 1 - маркер, снизу вверх: 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 5000 п.о., соответственно; дорожки 2, 3, 4, 5 - потомки гомозиготных мутантов; дорожки 6, 7 - потомки дикого типа, полученные путем сегрегации; дорожки 8, 9, 10 - потомки гетерозиготных мутантов.

Подробное описание вариантов осуществления изобретения

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

Все материалы и реагенты, использованные в следующих примерах, можно получить из коммерче-

ских источников, если не указано иное.

Экспрессионный вектор pZmU3-gRNA был раскрыт в "Liang, Y. и соавт. Таргетированный мутагенез в *Zea mays* с использованием TALENs и системы CRISPR/Cas. *Journal of Genetics and Genomics*. 41:63-68, (2014)".

Экспрессионный вектор pJIT163-Ubi-Cas9 был раскрыт в "Wang, Y. и соавт. Совместное редактирование трех гомеоаллелей в гексаплоидной мягкой пшенице придает наследуемую устойчивость к мучнистой росе. *Nature Biotechnology*. 32, 947-951 (2014)".

Экспрессионные векторы pHSN401 и pBUE411 были раскрыты в "Xing, H. и соавт. Набор CRISPR/Cas9 для мультиплексного редактирования геномов в растениях. *BMC Plant Biology*. 14:327, (2014)".

Кукуруза сорта HiII была раскрыта в "Armstrong, C.L., Green, C.E. & Phillips, R.L. Создание и доступность идиоплазмы с высоким уровнем формирования культур класса II. *Maize Genet. Coop. News Lett.* 65,92-93 (1991)".

Кукуруза сорта B73 была раскрыта в "Russell, W.A. Регистрация родительских линий B70 и B73 кукурузы. *Crop Sci.* 12, 721 (1972)".

Кукуруза сорта Zheng58 была раскрыта в "Zhang Falin, Селекция и использование инбредной линии Zheng58 кукурузы. *Crop Journal*, 2001 (4):31-31".

Arabidopsis thaliana экотипа Columbia был раскрыт в "Koorneef, M. и соавт. Генетическая карта *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Heredity*. 74,265-272 (1983)".

Среда MS: 4,43 г/л MS солей (Sigma, M5524), 30 л сахарозы, 3 г/л фитогеля, pH 5,7, автоклавировали при 121°C в течение 20 мин.

Среда LB: 10 г/л триптона, 5 г/л экстракта дрожжей, 10 г/л NaCl, pH 7,0 (для уплотнения среды LB на литр жидкой среды добавляли 15 г агара), автоклавировали при 121°C в течение 20 мин.

Растворы, использованные для приготовления и трансформации протопластов, представлены в табл. 1-6.

Таблица 1. 50 мл раствор для энзимолита *Arabidopsis*

	Добавляемое количество	Окончательная концентрация
Целлюлоза R10	0,75 г	1,5%
Мацерозим R10	0,15 г	0,3%
Маннитол	3,6434 г	0,4 М
2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота	0,2132 г	20 мМ
KCl	0,074 г	20мМ
доводили раствор водой двойной дистилляции до 50 мл, pH регулировали до 5,7 с помощью KOH; инкубировали на водяной бане при 55°C в течение 10 мин и охлаждали при комнатной температуре перед добавлением		
CaCl ₂	0,0735 г	10 мМ
BSA	0,05 г	0,1%
фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм		

Таблица 2. 50 мл раствор для энзимолита кукурузы

	Добавляемое количество	Окончательная концентрация
Целлюлоза R10	0,75 г	1,5%
Мацерозим R10	0,15 г	0,3%
Маннитол	5,4651 г	0,6 М
2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота	0,1066 г	10 мМ
доводили раствор водой двойной дистилляции до 50 мл, pH регулировали до 5,7 с помощью KOH; инкубировали на водяной бане при 55°C в течение 10 мин и охлаждали при комнатной температуре перед добавлением		
CaCl ₂	0,00735 г	1 мМ
BSA	0,05 г	0,1%
фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм		

Таблица 3. 500 мл W5

	Добавляемое количество	Окончательная концентрация
NaCl	4,5 г	154 мМ
CaCl ₂	9,189 г	125 мМ
KCl	0,1864 г	5 мМ
2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота	0,4264 г	4 мМ
доводили раствор водой двойной дистилляции до 500 мл, pH регулировали до 5,7 с помощью NaOH		

Таблица 4. 250 мл раствор WI

	Добавляемое количество	Окончательная концентрация
Маннитол	27,34 г	0,6 М
KCl	0,0745 г	4 мМ
2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (200 мМ)	0,2135 г	4 мМ
доводили раствор водой двойной дистилляции до 250 мл, pH регулировали до 5,7 с помощью KOH		

Таблица 5. 10 мл раствор MMG

	Добавляемое количество	Окончательная концентрация
Маннитол (0,8 М)	5 мл	0,4 М
MgCl ₂ (1 М)	0,15 мл	15 мМ
2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (200 мМ)	0,2 мл	4 мМ
Вода двойной дистилляции	до 10 мл	

Таблица 6. 4 мл раствор PEG

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

В табл. 1-6, выше, % раствора означает количество единиц массы в единице объема, г/100 мл.

Трансформация *Agrobacterium tumefaciens*:

- 1) компетентные клетки (хранили при -80°C) оттаивали на льду, затем добавляли 2 мкг плазмидной ДНК и перемешивали, смесь помещали на 30 мин на лед;
- 2) пробирку типа Эппендорф погружали в жидкий азот на 1 мин и быстро переносили в водяную баню при 37°C для оттаивания (2 мин);
- 3) затем добавляли 1 мл жидкой среды LB и инкубировали при 28°C в течение 4-5 ч при низкой скорости перемешивания (150 об/мин);
- 4) бактериальные клетки собирали путем центрифугирования 30 с при частоте 10000 об/мин, супернатант сливали и 100 мкл ресуспендированных бактериальных клеток помещали в планшеты с селективной средой, содержащей соответствующие антибиотики;
- 5) планшеты инкубировали перевернутыми при 28°C до появления белых колоний (трансформантов).

Пример 1. Сайт-направленное редактирование эндогенного гена ZmIPK кукурузы при помощи подхода с использованием прорастающих пыльцевых трубок и подхода на основе регенерации стеблевых апексов

I. Дизайн целевого фрагмента: мишень-C1.

Мишень-C1: 5'-CCGAGCTCGACCACGCCGCCGAC-3'; (положение 393-415 гена ZmIPK, как показано в GenBank, код доступа AY172635).

II. Приготовление плазмиды pZmU3-gRNA и плазмиды pBUE411, содержащих сайт C1.

C1 представляет собой последовательность ДНК для синтеза РНК, которая может комплементарно связываться с мишенью-C1.

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

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

C1-2F: 5'-GGCGGTCGGCGGGCGTGGTCGAGCT-3';

C1R: 5'-AAACAGCTCGACCACGCCGCCGAC-3'.

Путем отжига C1-1F и C1R формировали двухцепочечную ДНК с липкими концами и инсерцировали между двумя сайтами рестрикции BbsI в плазмиду pZmU3-gRNA, в результате чего получали плазмиду pZmU3-gRNA, содержащую сайт C1. Положительную плазмиду выявляли путем секвенирования. Рекомбинантная плаزمиды, которая была получена в результате инсерции фрагмента ДНК, как показано в 5'-AGCAGTCGGCGGGCGTGGTCGAGCT-3', в направлении вверх по течению в сайте рестрикции BbsI плазмиды pZmU3-gRNA, была положительной и была обозначена как pZmU3-gRNA-C1.

Путем отжига C1-2F и C1R формировали двухцепочечную ДНК с липкими концами и инсерцировали между двумя сайтами рестрикции BbsI в плазмиду pBUE411, в результате чего получали плазмиду pBUE411, содержащую сайт C1. Положительную плазмиду выявляли путем секвенирования. Рекомби-

нантная плаزمида, которая была получена в результате инсерции фрагмента ДНК, как показано в 5'-GGCGGTCGGCGGCGTGGTCGAGCT-3', в направлении вверх по течению в сайте рестрикции BbsI плазмиды pBUE411, была положительной и была обозначена как pBUE411-C1.

III. Введение системы gRNA:Cas9 в протопласты кукурузы.

Вектор pJIT163-Ubi-Cas9 и плазмиду pZmU3-gRNA-C1, полученную на этапе II, вводили в протопласты кукурузы. Этот специфический процесс включает:

1. Выращивание сеянцев кукурузы.

Семена кукурузы гибридного сорта HiII и инбредных линий B73 и Zheng58 на ночь замачивали в воде и переносили в планшет с абсорбирующей бумагой (с добавлением воды), выдерживали в условиях освещенности в течение 3 дней для прорастания. Проросшие семена растили в почве при 24°C в течение 10-11 дней, в результате получали сеянцы кукурузы.

2. Выделение протопластов.

1) Брали нежные листья кукурузы, из средней части листьев нарезали 0,5-1 мм нити с помощью лезвия, которые помещали в 50 мл раствор для энзимоллиза на 5 ч для расщепления (0,5 ч энзимоллиз проводили в вакууме, затем 4,5 ч при медленном встряхивании при 10 об/мин).

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

2) Продукт энзимоллиза растворяли путем добавления 30 мл W5 и фильтровали в 50 мл круглодонной центрифужной пробирке с использованием нейлоновой фильтровальной мембраны с размером пор 75 мкм.

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

3) Проводили центрифугирование (150 г, 3 мин, 23°C) и сливали супернатант.

4) Пеллету суспендировали в 10 мл W5, центрифугировали (150 г, 3 мин), супернатант сливали.

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

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

3. Трансформация протопластов кукурузы.

1) 10 мкг вектора pJIT163-2NLSCas9 и 10 мкг плазмиды pZmU3-gRNA-C1 вносили в 2 мл центрифужную пробирку. С помощью пипетки прибавляли 200 мкл протопластов, содержимое смешивали, слегка постукивая по пробирке пальцем, и отстаивали в течение 3-5 мин. Затем прибавляли 220 мкл раствора PEG4000 и перемешивали, слегка постукивая по пробирке пальцем. Трансформацию проводили в темноте в течение 15 мин;

2) Прибавляли 880 мкл W5 (комнатной температуры) и перемешивали путем реверсивного вращения, проводили центрифугирование (100 г, 3 мин), супернатант сливали;

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

IV. Проведение ПЦР/RE-экспериментов для анализа мутагенеза эндогенного гена ZmIPK кукурузы с использованием системы gRNA:Cas9.

Через 48 ч после трансформации протопластов кукурузы экстрагировали геномную ДНК, которую использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР/RE (полимеразная цепная реакция/рестриктное расщепление). Одновременно протопласты кукурузы сорта HiII дикого типа использовали в качестве контроля. Анализ методом ПЦР/RE основывается на работе Shan, Q. и соавт. "Быстрая и эффективная модификация генов риса и Brachypodium с использованием TALENs. Molecular Plant (2013)". Поскольку целевой фрагмент (код доступа, GenBank: AY172635, положения 393-415) эндогенного гена ZmIPK кукурузы (код доступа, GenBank: AY172635) содержит последовательность узнавания (5'-GAGCTC-3') эндонуклеазы рестрикции SacI, то эндонуклеазу рестрикции SacI использовали в эксперименте по проведению ПЦР/RE-теста. Для проведения ПЦР-амплификации использовались следующие праймеры:

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

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

Результаты ПЦР/RE экспериментов можно видеть на фиг. 1. Эти результаты показали, что в целевом участке гена ZmIPK происходили мутации, неразрезанные полоски были выделены и секвенированы, результаты секвенирования показали, что в целевом участке гена ZmIPK имела место инсерция/делеция (индел).

V. Сайт-специфическое редактирование эндогенного гена ZmIPK кукурузы посредством подхода с использованием прорастающих пыльцевых трубок.

Проникающие в клетки пептиды (CPPs) представляют собой класс коротких пептидов, способных доставлять в клетки макромолекулы (включая белки и нуклеиновые кислоты). Последние исследования

показали, что проникающие в клетки пептиды, при связывании с ДНК, способны защитить ДНК от энзиматической деградации. Поэтому проникающие в клетки пептиды обычно применяют в подходе с использованием прорастающих пыльцевых трубок для улучшения эффективности подхода.

1) Приготовление раствора ДНК, содержащего CPPs: из плотного порошка CPPs (аминокислотная последовательность - RKKRRQRRRKRRRQRRR, синтезированная Shanghai Bio-engineering Co., Ltd.) в стерилизованной воде приготавливали 30 мг/мл маточного раствора. CPPs добавляли в смесь из плазмид pZmU3-gRNA-C1 и pJIT163-Ubi-Cas9 (весовое соотношение pZmU3-gRNA-C1 к pJIT163-Ubi-Cas9 в смеси - 1:1) в весовом соотношении 1:1 пока окончательная концентрация ДНК и CPPs не составила 25-30 мкг/мл (суммарная окончательная концентрация обеих плазмид - 25-30 мкг/мл, окончательная концентрация CPPs - 25-30 мкг/мл).

2) В качестве растений-реципиентов в поле отобрали сильные растения кукурузы (HiII, B73 и Zheng58). После цветения на рыльца растений надевали защитные мешочки, чтобы избежать перекрестного опыления или самоопыления. В строго определенный срок проводили ручное опыление. Через 18-21 ч после опыления защитные мешочки снимали, пестичные нити и кроющие литья обрезали до длины 2-3 см с верхней части оставленных початков. Поскольку площадь поперечного сечения среза у пестичных нитей несколько меньше, чем у кроющих листьев, то в результате между пестичными нитями и кроющими листьями образовывалось небольшое углубление, в которое пипеткой быстро закапывали 300-400 мкл раствора ДНК, получаемого на этапе 1). Пестичные нити оказывались погруженными в раствор ДНК, и на рыльца снова надевали защитные мешочки. В каждом эксперименте участвовало 40-50 початков кукурузы. После созревания зерен початки кукурузы собирали и сушили по отдельности.

3) Высушенные семена проращивали и после прорастания семян проводили детекцию мутантов гена ZmIPK методом ПЦР-RE (что касается конкретных шагов и используемых праймеров, см. IV).

Мутанты получали посредством подхода с использованием прорастающих пыльцевых трубок для растений кукурузы различных генотипов. Результаты детекции некоторых мутантов представлены на фиг. 2-4 и показывают, что мутации происходили внутри целевого участка гена ZmIPK у разных сортов кукурузы. Неразрезанные полоски были выделены и секвенированы, результаты секвенирования показали, что в целевом участке гена ZmIPK имела место инсерция/делеция (индел). Таким образом, показано, что мутанты можно получать на уровне целого растения посредством подхода с использованием прорастающих пыльцевых трубок по данному изобретению, независимо от генотипа растения или растения-реципиента.

VI. Сайт-направленное редактирование эндогенного гена ZmIPK кукурузы при помощи подхода на основе регенерации стеблевых апексов

1. Приготовление материалов кукурузы.

1) Семена кукурузы инбредной линии HiII помещали в треугольную колбу, стерилизовали 70% (объемных процентов) спиртом в течение 5 мин и 5% (объемных процентов) раствором гипохлорита натрия в течение 30 мин, затем промывали в пяти порциях стерильной воды. Добавляли 1,5 объема воды, колбу герметично закрывали и инкубировали в течение 4-6 ч при 28°C.

2) Вторая стерилизация. Семена стерилизовали 5% (объемных процентов) раствором гипохлорита натрия в течение 30 мин, после чего промывали в пяти порциях стерильной воды.

3) Стерилизованные семена помещали в стерилизованный планшет с фильтровальной бумагой, инкубировали при температуре 28°C в течение 3-4 дней в условиях темноты для прорастания. Проросшие семена однородного роста переносили на среду MS и культивировали в темноте при 28°C в течение 3-4 дней до достижения проростками высоты 4-5 см.

2. Регенерация стеблевых апексов кукурузы.

1) Разрезание почек: на стеблях выполняли поперечные надрезы на расстоянии 1,5-2 мм выше узлов кушения, раскрывая почки внутри стебля. Затем почки разрезали по центру в продольном направлении на расстоянии 0,2 мм ниже узлов кушения (либо по узлам кушения). Сохраняли около 0,8 мм корней.

2) Плазмиду pBUE411-C1, содержащую C1, трансформировали в *Agrobacterium*-компетентную клетку AGL1. После верификации методом ПЦР и рестриктоного расщепления растения инфицировали путем использования положительного штамма.

3) Положительный штамм помещали в планшет, содержащий твердую среду LB, и культивировали в темноте при 28°C в течение 2 дней. Некоторое количество бактерий соскребали в 20 мл жидкую MS-среду, культивировали при 28°C до OD₆₀₀=0,8. Затем добавляли 200 мкМ ацетосирингона.

4) Надрезанные растения помещали в планшет надрезами вниз. Планшет помещали наклонно (30-45°C) в вакуумное устройство; добавляли раствор *Agrobacterium* для покрытия надрезов и выдерживали 20 мин, чтобы вызвать инфицирование. Во время инфицирования проводили вакуумирование в течение 10 мин, давление 0,05 МР.

5) После инфицирования растения извлекали из раствора *Agrobacterium* (избыточный раствор *Agrobacterium* на растениях удаляли с помощью фильтровальной бумаги) и помещали в MS-среду, культивировали в темноте при 23°C в течение 3 дней.

6) После культивирования материалы извлекали и промывали, чтобы удалить среду, и после этого растили в горшке (4/5 обычной почвы и сверху 1/5 вермикулита). После пересадки сеянцы культивиру-

вали при 28°C в темноте в течение 2 дней, затем 7-10 дней на свету и после этого при нормальных условиях до плодоношения. Полученные семена кукурузы растили и тестировали по гену ZmIPK посредством метода ПЦР-RE после прорастания.

Результаты показали, что в целевом участке гена ZmIPK происходили мутации. Неразрезанные полоски выделяли для секвенирования. Результаты секвенирования показали, что в гене ZmIPK имела место инсерция/делеция (индел).

VII. Определение присутствия pZmU3-gRNA-C1 и pJIT163-Ubi-Cas9 в мутантах кукурузы, полученных посредством подхода с использованием прорастающих пыльцевых трубок.

Проводили дизайн двух наборов праймеров согласно последовательностям плазмиды pZmU3-gRNA-C1 и плазмиды pJIT163-Ubi-Cas9 для амплификации обеих плазмид, соответственно.

ZmU3-F/CIR располагался между ZmU3 и целевым фрагментом:

ZmU3-F: 5'-CTGCCAAGATCAACAGCAACCA-3';

CIR: 5'-AAACAGCTCGACCACGCCGCCGAC-3'.

Теоретически, амплифицированный фрагмент должен быть длиной около 322 п.о., а последовательность должна быть в положении 467-788 SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность pZmU3-gRNA-C1.

Cas9-1F/Cas9-1R располагался на векторе pJIT163-Ubi-Cas9:

Cas9-1F: 5'-CTTCCCAAGCATTCCCTCCTGT-3';

Cas9-1R: 5'-CTTATGCCGTCCCATGACCTTC-3'.

Теоретически, амплифицированный фрагмент должен быть длиной около 744 п.о., а последовательность должна быть в положении 1573-2316 SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 2 представляет собой последовательность pJIT163-Ubi-Cas9.

Целевые полоски не были амплифицированы для всех растений (фиг. 5), что свидетельствует о том, что способ по настоящему изобретению препятствует инсерции или переносу трансгена при осуществлении сайт-направленной модификации растения, и что получаемый мутант обладает относительно более высокой биобезопасностью.

VIII. Определение присутствия pBUE411-C1 в мутантах кукурузы, получаемых при помощи подхода на основе регенерации стеблевых апексов

Проводили дизайн двух наборов праймеров согласно последовательности плазмиды pBUE411-C1 для амплификации OsU3p и Cas9, соответственно.

pBUE411-1F/C1R располагался между OsU3p и целевым фрагментом:

pBUE411-1F: 5'-GACAGGCGTCTTCTACTGGTGCTAC-3';

C1R: 5'-AAACAGCTCGACCACGCCGCCGAC-3'.

Теоретически, амплифицированный фрагмент должен быть длиной около 289 п.о., а последовательность должна быть в положении 174-462 SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 3 представляет собой последовательность gRNA pBUE411-C1.

CAS9-2F/CAS9-2R располагался в области Cas9 на векторе pBUE411-C1:

CAS9-2F: 5'-CTCCCTAAGCACTCGCTCCTGT-3';

CAS9-2R: 5'-TTCTGCGTGGTCTGATTCTCCC-3'.

Теоретически, амплифицированный фрагмент должен быть длиной около 794 п.о., а последовательность должна быть в положении 1639-2432 SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 4 представляет собой последовательность Cas9 pHSN411-C1.

Целевые полоски не были амплифицированы для всех растений, что свидетельствует о том, что способ по настоящему изобретению препятствует инсерции или переносу трансгена при осуществлении сайт-направленной модификации растения, и что получаемый мутант обладает относительно более высокой биобезопасностью.

Пример 2. Сайт-направленное редактирование эндогенного гена AtPTPA Arabidopsis посредством подхода на основе погружения соцветий.

I. Дизайн целевого фрагмента: мишень-C2.

Мишень-C2: 5'-CCGACGATATCCGCCGATTTAC-3'; (положение 351-373 гена, AtPTPA, код доступа, GenBank: AF360133).

II. Приготовление плазмиды pHSN401, содержащей фрагмент C2.

C2 представляет собой последовательность ДНК для синтеза РНК, которая может комплементарно связываться с мишенью-C2.

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

C2F: 5'-ATTGGTGAAATCGGCGGATATCGT-3';

C2R: 5'-AAACACGATATCCGCCGATTTAC-3'.

Путем отжига олигонуклеотидов формировали двухцепочечную ДНК с липкими концами и инсерцировали между двумя сайтами рестрикции BsaI в плазмиду pHSN401, в результате чего получали плазмиду pHSN401, содержащую сайт C2. Положительную плазмиду выявляли путем секвенирования. Рекомбинантная плазида, которая была получена в результате инсерции фрагмента ДНК, как показано в 5'-ATTGGTGAATCGGCGGATATCGT-3', в направлении вверх по течению в сайте рестрикции BsaI плазмиды pHSN401, была положительной и была обозначена как pHSN401-C2.

III. Введение системы gRNA:Cas9 в протопласты Arabidopsis.

Плазмиду pHSN401-C2, получаемую на этапе II, вводили в протопласты Arabidopsis экотипа Columbia. Этот специфический процесс включает:

1. Выращивание семян Arabidopsis.

1) Обработка семян: Семена Arabidopsis экотипа Columbia помещали в 1,5 мл колбу и замачивали в 75% (объемных процентов) спирте в течение 1 мин и 10% (объемных процентов) растворе гипохлорита натрия в течение 15 мин, затем промывали в 5-6 порциях стерильной воды.

2) Стерилизованные семена, каждое в отдельности, с помощью микропипетки переносили в планшет, содержащий среду MS. Планшеты герметично закрывали и держали 3-4 дня при 4°C для яровизации.

3) После яровизации планшеты переносили в инкубатор, культивировали при следующих условиях: 25±2°C, освещенность 5500±300 люкс, световой режим 12 ч день/ночь. Через 3 недели сеянцы пересаживали.

4) Сеянцы аккуратно пересаживали в грунт (торф: вермикулит: перлит = 1:1:1), накрывали пленкой на 3-4 дня, после этого культивировали при 21°C, освещенность 6300±300 люкс.

2. Выделение протопластов.

1) Брали нежные листья Arabidopsis экотипа Columbia (выращиваемого около 1 месяца) и нарезали 0,5 мм нити с помощью лезвия, которые помещали в 50 мл раствор для энзимолита на 5 ч для расщепления (0,5 ч энзимолит проводили в вакууме, затем 4,5 ч при медленном встряхивании при 10 об/мин).

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

2) Продукт энзимолита растворяли путем добавления 30 мл W5 и фильтровали в 50 мл круглодонной центрифужной пробирке с использованием нейлоновой фильтровальной мембраны с размером пор 75 мкм.

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

3) Проводили центрифугирование (60 г, 5 мин, 23°C) и сливали супернатант.

4) Пеллету ресуспендировали в 10 мл W5 аккуратным встряхиванием; центрифугировали (60 г, 5 мин) и супернатант сливали.

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

Примечание: концентрацию протопластов необходимо определять путем микроскопии (×100). Количество протопластов составило от 2×10⁵/мл до 1×10⁶/мл.

3. Трансформация протопластов Arabidopsis.

1) 200 мкг плазмиды pHSN401-C2 вносили в 2 мл центрифужную пробирку. С помощью пипетки прибавляли 200 мкл протопластов, полученных на этапе 2, содержимое смешивали, слегка постукивая по пробирке пальцем. Затем прибавляли 250 мкл PEG4000 и перемешивали, слегка постукивая по пробирке пальцем. Трансформацию проводили в темноте в течение 15-30 мин.

2) Прибавляли 880 мкл W5 (комнатной температуры) и перемешивали путем реверсивного вращения, проводили центрифугирование (60 г, 5 мин), супернатант сливали.

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

IV. Проведение ПЦР/RE-экспериментов для анализа сайт-направленного мутагенеза эндогенного гена AtPTPA Arabidopsis с использованием системы gRNA:Cas9.

Через 48 ч после трансформации протопластов Arabidopsis экстрагировали геномную ДНК, которую использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР/RE (полимеразная цепная реакция/рестриктное расщепление) экспериментального анализа. Анализ методом ПЦР/RE основывается на работе Shan, Q. и соавт. "Быстрая и эффективная модификация генов риса и Brachypodium с использованием TALENs. Molecular Plant (2013)". Поскольку целевой фрагмент (код доступа, GenBank: AF360133, положения 351-4373) эндогенного гена AtPTPA Arabidopsis (код доступа, GenBank: AF360133) содержит последовательность узнавания (5'-GATATC-3') эндонуклеазы рестрикции EcoRV, то эндонуклеазу рестрикции EcoRV использовали в эксперименте по проведению ПЦР/RE-теста. Для проведения ПЦР-амплификации использовались следующие праймеры:

PTPA-F: 5'-GATGCTCCAGCCACCATATC-3';

PTPA-R: 5'-CAGTTCGGTACACCACTTATATCA-3'.

Результаты ПЦР/RE экспериментов можно видеть на фиг. 6. Эти результаты показали, что в целевом участке гена AtPTPA происходили мутации, неразрезанные полоски, показанные на фиг. 6, были выделены и секвенированы, результаты секвенирования показали, что в целевом участке гена AtPTPA имела место инсерция/делеция (индел).

V. Сайт-специфическое редактирование эндогенного гена AtPTPA Arabidopsis посредством подхода на основе погружения соцветий:

1) Приготовление материалов Arabidopsis.

Почки Arabidopsis удаляли при первом цветении, чтобы стимулировать ветвление.

2) Плазмиду pHSN401-C2, содержащую C2, трансформировали в Agrobacterium-компетентную клетку GV3101. После верификации методом ПЦР и рестриктоного расщепления растения инфицировали путем использования положительного штамма.

3) Положительный штамм Agrobacterium помещали в 2 мл колбу на 8-10 ч, планшет затем переносили в 200 мл твердой среды LB (инокулированной в соотношении 1:100) и культивировали в течение ночи до OD₆₀₀ около 0,8~1,0. Клетки Agrobacterium собирали путем центрифугирования в течение 15 мин и ресуспендировали в инфекционный буфер (2,16 г/л MgCl₂·6H₂O, 5% сахароза, 0,02% silwet L-77) для заражения растений.

4) Соцветия Arabidopsis погружали в 100 мл инфекционный буфер, содержащийся в большой плашке, на 2 мин при постоянном вращении растений. После инфицирования избыточный раствор Agrobacterium на растениях удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Растения накрывали черным пластиковым мешком или пленкой на 24 ч в условиях темноты. Поскольку период цветения Arabidopsis относительно продолжительный, обычно требуются 2-3 заражения.

5) Растения растили в нормальных условиях. Семена T1 собирали и проращивали. После прорастания ген AtPTPA тестировали методом ПЦР-RE (что касается конкретных шагов и используемых праймеров, см. IV). Из 500 полученных растений 20 были мутантами по гену AtPTPA. В качестве контроля использовали Arabidopsis экотипа Columbia дикого типа.

Результаты, представленные на фиг. 7, показывают, что в целевом участке гена AtPTPA происходили мутации. Неразрезанные полоски на фиг. 7 выделяли и секвенировали. Результаты секвенирования показали, что в целевом участке гена гена AtPTPA имела место инсерция/делеция (индел).

6) В отношении 20 мутантов, полученных на этапе 5), проводили ПЦР, чтобы определить в них присутствие pHSN401-C2. Для амплификации проводили дизайн 2 наборов праймеров (мишень в отношении U6-26p и Cas9, соответственно).

pHSN401-1F/C2R располагался между U6-26p и целевым фрагментом:

pHSN401-1F: 5'-TGTCCCAGGATTAGAAATGATTAGGC-3';

C2R: 5'-AAACACGATATCCGCCGATTTTAC-3'.

Теоретически, амплифицированный фрагмент должен быть длиной около 286 п.о., а последовательность должна быть в положении 170-455 SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 5 представляет собой часть последовательности gDNA в pHSN401-C2.

CAS9-2F/CAS9-2R располагался в области Cas9 вектора pHSN401-C2:

CAS9-2F: 5'-CTCCCTAAGCACTCGCTCCTGT-3';

CAS(-2R: 5'-TTCTGCGTGGTCTGATTCTCCC-3'.

Теоретически, амплифицированный фрагмент должен быть длиной около 794 п.о., а последовательность должна быть в положении 1639-2432 SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 4 представляет собой последовательность Cas9 в pHSN401-C2.

Гельэлектрофореграмма амплификации гена-мутанта AtPTPA Arabidopsis с использованием праймеров pHSN401-1F/C2R на pHSN401-C2 показана на фиг. 8a. Гельэлектрофореграмма амплификации гена-мутанта AtPTPA Arabidopsis с использованием праймеров CAS9-2F/CAS9-2R на pHSN401-C2 показана на фиг. 8b. Как можно видеть, целевые полоски не были амплифицированы у генов-мутантов AtPTPA Arabidopsis, полученных на этапе 5), что свидетельствует о том, что в мутантах отсутствовали фрагменты gDNA:Cas9.

7) Из потомства 20 мутантов, полученных на этапе 5), случайно отбирали 9 растений для анализа методом ГГЦР-RE. Результаты представлены на фиг. 9. Как можно видеть, приобретаемая мутация гена AtPTPA Arabidopsis может стабильно передаваться потомкам. Таким образом, способ по данному изобретению препятствует инсерции или переносу трансгена при осуществлении сайт-направленной модификации растения, что исключает общественные беспокойности относительно безопасности трансгенных продуктов. При этом также исключается процесс культуры тканей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ создания мутантного нетрансгенного растения, состоящий из следующих этапов: транзientной экспрессии последовательность-специфической нуклеазы в растении, характеризующейся тем, что в качестве объекта используется целое растение, и включающий:

а) введения последовательность-специфической нуклеазы CRISPR-ассоциированной системы, которая расщепляет целевой фрагмент с достижением сайт-направленной модификации посредством саморепарации ДНК растения или генетического материала для экспрессии указанной последовательность-специфической нуклеазы в растение через пыльцевую трубку, соцветие, стеблевой апекс или завязь, и

б) выращивания растения, получаемого на этапе а), в отсутствие селективного давления, при этом последовательность-специфическая нуклеаза или генетический материал, не интегрировавшийся в хромосому растения, деградируется, таким образом, напрямую получая нетрансгенное T1 мутантное растение, содержащее сайт-направленную модификацию на уровне непосредственно целого растения, при этом отсутствует этап культивирования тканей;

при этом генетический материал представляет собой рекомбинантный вектор или линейный фрагмент ДНК, либо РНК, транскрибированную *in vitro*.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что последовательность-специфическая нуклеаза или генетический материал вводится через

а) пыльцевую трубку, введение осуществляют путем инъекции раствора, содержащего рекомбинантный вектор или линейный фрагмент ДНК, либо РНК, транскрибированную *in vitro*, или раствора, содержащего последовательность-специфическую нуклеазу, в рыльце после опыления;

б) соцветие, введение осуществляют путем погружения соцветия в раствор *Agrobacterium tumefaciens*, несущий рекомбинантный вектор или линейный фрагмент ДНК.

с) стеблевой апекс, введение осуществляют путем погружения стеблевого апекса в раствор *Agrobacterium tumefaciens*, несущий рекомбинантный вектор или линейный фрагмент ДНК.

д) завязь, введение осуществляют путем инъекции раствора, содержащего рекомбинантный вектор или линейный фрагмент ДНК, либо РНК, транскрибированную *in vitro*, или раствора, содержащий последовательность-специфическую нуклеазу, в завязь после опыления, либо путем инъекции раствора *Agrobacterium tumefaciens*, несущего рекомбинантный вектор или линейный фрагмент ДНК, в завязь после опыления.

3. Способ по любому из пп.1-2, отличающийся тем, что последовательность-специфическая нуклеаза CRISPR-ассоциированных систем представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas9, генетический материал включает рекомбинантный вектор или фрагмент ДНК, способный транскрибировать направляющую РНК и экспрессировать белок Cas9; либо генетический материал включает рекомбинантный вектор или фрагмент ДНК, способный транскрибировать направляющую РНК, и рекомбинантный вектор или фрагмент ДНК, либо РНК, способные экспрессировать белок Cas9; либо генетический материал включает направляющую РНК, и рекомбинантный вектор или фрагмент ДНК, либо РНК, способные экспрессировать белок Cas9; при этом направляющая РНК представляет собой РНК палиндромной структуры, образующуюся путем частичного спаривания оснований между *cr*РНК и *tracr*РНК, и *cr*РНК содержит фрагмент РНК, способный комплементарно связываться с целевым фрагментом.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что сайт-направленная модификация представляет собой инсерцию, делецию и/или мутационную замену в целевом фрагменте.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что в растении, получаемом на этапе б) функции гена-мишени утеряны и его геном свободен от интегрированного экзогенного гена.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающиеся тем, что растение представляет собой растение любого генотипа.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что растение выбирают из группы, включающей кукурузу, пшеницу, сою, хлопок, табак, *Arabidopsis*, рожь, *Rosa roxbunghii*, *Eriobotrya japonica*, *Carya paraya*, *Rosa canina*, *Dendrobium nobile* Lindl., *Brassica oleracea*, *Fagopyrum tataricum* и *Hevea brasiliensis*.

8. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что растение представляет собой кукурузу, последовательность-специфическая нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas9, ген-мишень представляет собой *ZmIPK*.

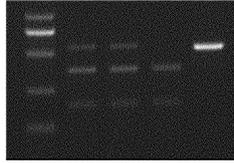
9. Способ по п.8, отличающийся тем, что целевой фрагмент представляет собой 5'-AGCTCGACCACGCCGCCGAC-3'; рекомбинантный вектор для транскрипции направляющей РНК получают путем инсерции фрагмента ДНК, представляющего собой 5'-AGCAGTCGGCGGCGTGGTTCGAGCT-3', между двумя сайтами рестрикции *BbsI* плазмиды *pZmU3-gRNA*; и рекомбинантный вектор для экспрессии нуклеазы CRISPR/Cas9 представляет собой *pJIT163-Ubi-Cas9*.

10. Способ по п.8, отличающийся тем, что целевой фрагмент представляет собой 5'-AGCTCGACCACGCCGCCGAC-3'; рекомбинантный вектор для транскрипции направляющей РНК и экспрессии нуклеазы CRISPR/Cas9 получают путем инсерции фрагмента ДНК, представляющего собой 5'-AGCAGTCGGCGGCGTGGTTCGAGCT-3', между двумя сайтами рестрикции *BbsI* плазмиды *pBUE411*.

11. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что растение представляет собой Arabidopsis, последовательность-специфическая нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR/Cas9, ген-мишень представляет собой AtPTPA.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что целевой фрагмент представляет собой 5'-AGCTCGACCACGCCGCGAC-3'; рекомбинантный вектор для транскрипции направляющей РНК и экспрессии нуклеазы CRISPR/Cas9 получают путем инсерции фрагмента ДНК, представляющего собой 5'-ATTGGTCAAATCGGCGGATATCGT-3', между двумя сайтами рестрикции *Bsa*I плазмиды pHSN401.

1 2 3 4 5



a

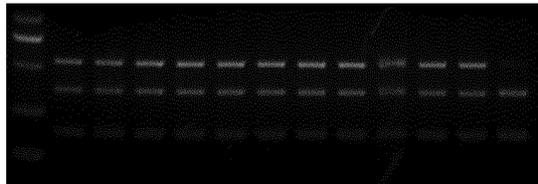
```

CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGAGCTCGACCACGCCGCGACCCAGGACAGCACTTT-3'   WT
CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGAGC...CGACCACGCCGCGACCCAGGACAGCACTTT   -1bp
CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGAGCaTCGACCACGCCGCGACCCAGGACAGCACTTT   +1bp
CCATGCTCCAGGTCGTCTCCG...CAGCCGCGACCCAGGACAGCACTTT   -8bp
    
```

b

Фиг. 1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



a

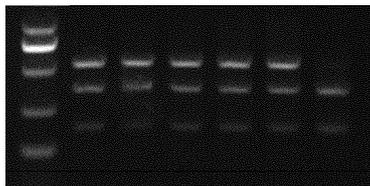
```

CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGAGCTCGACCACGCCGCGACCCAGGACAGCACTTT-3'   WT
CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGAGC...CGCCGACCCAGGACAGCACTTT   -10bp
CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGAG...CCACGCCGCGACCCAGGACAGCACTTT   -5bp
CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGA...CCACGCCGCGACCCAGGACAGCACTTT   -6bp
    
```

b

Фиг. 2

1 2 3 4 5 6 7



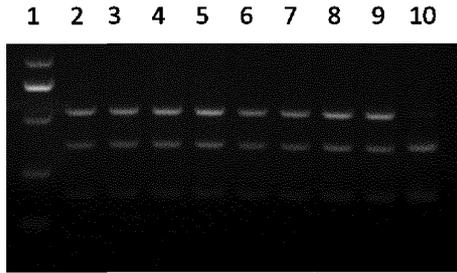
a

```

CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGAGCTCGACCACGCCGCGACCCAGGACAGCACTTT-3'   WT
CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGAG...CGACCACGCCGCGACCCAGGACAGCACTTT   -2bp
CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGAGCCTCGACCACGCCGCGACCCAGGACAGCACTTT   +1bp
CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGA...CAGCCGCGACCCAGGACAGCACTTT   -7bp
    
```

b

Фиг. 3



a

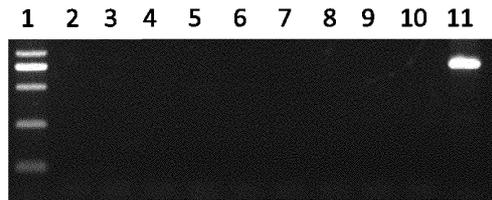
CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGAGCTCGACCCAGCGCCGACCAGGACAGCACTTT-3' WT
 CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGAG.....CGCCGACCAGGACAGCACTTT -11bp
 CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGAGC.....CGCCGACCAGGACAGCACTTT -9bp
 CCATGCTCCAGGTCGTCTCCGAG..CGACCCAGCGCCGACCAGGACAGCACTTT -2bp

b

Фиг. 4

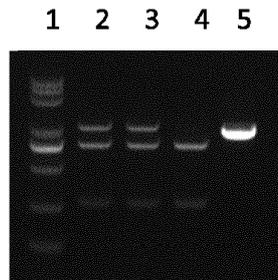


a



b

Фиг. 5



a

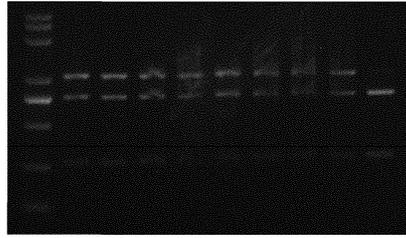
CTATCATTTCCAATCTCCCGTCAAACGGAATCCACTCTCCCGACGATATCCGCCGATTTACGAATCCGGT-3' WT
 CTATCATTTCT-----ACGAATCCGGT -49bp
 CTATCATTTCCAATCTCCCGTCAAACGGAATCCACTCTCCCGACGATATATCCGCCGATTTACGAATCCGGT +1bp

b

Фиг. 6

039511

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



a

```
СТАТCAИТТCCAATCTCCCGTCAAACGAATCCACTCTCCCGACG-ATATCCGCCGATTCACGAATCCGCT   WT
СТАТCAИТТC-----ACGAATCCGCT   -49bp
СТАТCAИТТCCAATCTCCCGTCAAACGAATCCACTCTCCCGACG-ATATCCGCCGATTCACGAATCCGCT   -1bp
СТАТCAИТТCCAATCTCCCGTCAAACGAATCCACTCTCCCGAC-----ATATCCGCCGATTCACGAATCCGCT   -1bp
СТАТCAИТТCCAATCTCCCGTCAAACGAATCCACTCTCCCGA-----CGACGATTCACGAATCCGCT   -7bp
СТАТCAИТТCCAATCTCCCGTCAAACGAATCCACTCTCCCGA-----CGATTCACGAATCCGCT   -10bp
СТАТCAИТТCCAAT-----ATCCGCCGATTCACGAATCCGCT   -32bp
```

b

Фиг. 7

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



a

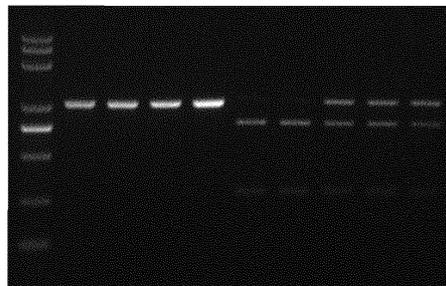
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



b

Фиг. 8

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Фиг. 9

