



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.09.15**

**(21)** Номер заявки  
**201892809**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.06.23**

**(51)** Int. Cl. **C12N 15/01** (2006.01)  
**C12N 15/10** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)

**(54) СПОСОБ СКРИНИНГА МУТАНТА В ПОПУЛЯЦИИ ОРГАНИЗМОВ С  
ПРИМЕНЕНИЕМ ПОДХОДА ОБЪЕДИНЕНИЯ В ПУЛЫ И РАЗДЕЛЕНИЯ**

**(31)** **РА 2016 70485**

**(32)** **2016.07.01**

**(33)** **DK**

**(43)** **2019.06.28**

**(86)** **PCT/EP2017/065516**

**(87)** **WO 2018/001884 2018.01.04**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**КАРЛСБЕРГ А/С (DK)**

**(72)** Изобретатель:  
**Вендт Тони, Олсен Оле, Кнудсен  
Сорен, Томсен Ханне Сесил, Страйбек  
Александр, Скадхауг Биргитт,  
Расмуссен Магнус Вольфарт, Карчофи  
Массимилиано (DK)**

**(74)** Представитель:  
**Угрюмов В.М., Гизатуллин Ш.Ф. (RU)**

**(56)** JACOBS H.T.: "Making mitochondrial mutants", TRENDS IN GENETICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 17, № 11, 1 November 2001 (2001-11-01), p. 653-660, XP004326517, ISSN: 0168-9525, DOI: 10.1016/S0168-9525(01)02480-5, abstract; fig. 5, p. 659, right col.;

GOODYEAR C.S. ET AL.: "Phage-Display Methodology for the Study of Protein-Protein Interactions: Overview", COLD SPRING HARBOR PROTOCOL, vol. 2008, № 9, 1 August 2008 (2008-08-01), XP055338090, United States, ISSN: 1940-3402, DOI: 10.1101/pdb.top48, fig. 1 and 3

GRIMM STEFAN: "The art and design of genetic screens: mammalian culture cells", NATURE REVIEWS GENETICS, vol. 5, № 3, 1 March 2004 (2004-03-01), p. 179-189, XP055242819, GB, ISSN: 1471-0056, DOI: 10.1038/nrg1291; fig. 2, 3, box 3

SLIGHTOM J.L. ET AL.: "Cloning and molecular characterization of the gene encoding the Aureobasidin A biosynthesis complex in Aureobasidium pullulans BP-1938", GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 431, № 1-2, 15 February 2009 (2009-02-15), p. 67-79, XP025770235, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/J.GENE.2008.11.011 [retrieved on 2008-11-24], abstract; item 2.5

BRUNDEN M.N. ET AL.: "Planning the purification process of active cDNA in expression cloning strategies", JOURNAL OF THEORETICAL BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 144, № 2, 22 May 1990 (1990-05-22), p. 145-154, XP009193215, ISSN: 0022-5193, the whole document

**(57)** В традиционных подходах к селекции растений химический мутагенез можно использовать для случайного введения нуклеотидных замен в геном растения, т.е. без возможности контролировать сайты нуклеотидных изменений. Когда дело касается поиска заданной нуклеотидной замены, статистическая вероятность является крайне низкой из-за сложности генома. В настоящем изобретении тем не менее продемонстрировано, как разработать новое альтернативное применение цифровой полимеразной цепной реакции (dPCR), предпочтительно капельной dPCR (ddPCR), для обнаружения конкретных нуклеотидных замен в мутантных генах. Вся платформа включает способ скрининга с библиотекой подвергнутых мутагенезу организмов, системы на основе цифровой ПЦР и установку для размножения и анализа выявленных мутантных организмов.

### **Область техники, к которой относится настоящее изобретение**

Настоящее изобретение относится к высокоускоренным способам и процессам, которые делают практически возможным расширение и осуществление получения, отбора и/или размножения организма с конкретной(ыми) заданной(ыми) мутацией(ями) по одному или нескольким представляющим интерес нуклеотидам (NOI). Способы по настоящему изобретению полезны, например, для повышения темпа и производительности при получении растений с конкретной(ыми) заданной(ыми) мутацией(ями) по одному или нескольким NOI.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Генетические способы создания генетически модифицированных (ГМ) организмов (ГМО) широко доступны. Однако для многих целей, особенно в пищевой промышленности и при производстве напитков, применение ГМО зачастую является менее желательным. Таким образом, сохраняется постоянная потребность в создании улучшенных и более точных способов традиционной селекции сельскохозяйственных культур, в том числе злаковых, таких как ячмень, просто для получения лучшего, уникального сырья для применения при разработке и производстве новых продуктов. Подобные недостатки существуют и в отношении других организмов, в том числе микроорганизмов и животных. К сожалению, в традиционных подходах селекции наблюдается острая нехватка способов детектирования мутаций в определенных нуклеотидах геномов, что ограничивает прогресс разработки сырья.

Существуют способы, позволяющие редактировать геном и вводить разрывы в двухцепочечную ДНК в целевых сайтах генома организма, например, с помощью методики CRISPR-Cas9 (Jiang и соавт., 2016). С технологией CRISPR-Cas9 остаются связаны два основных осложнения:

во-первых, методику CRISPR-Cas9 можно рассматривать как ГМ-методику; таким образом, отсутствует основная законодательная информация о том, как власти стремятся регулировать новые генетические инструменты по редактированию генома, включая введение разрывов двухцепочечной ДНК в целевых сайтах в геноме;

во-вторых, существуют серьезные осложнения, связанные с нецелевыми расщеплениями при использовании методики CRISPR-Cas9.

Мутации зародышевой линии в природном контексте, например, приводящие к фенотипическим последствиям в организмах, представляют как основную причину изменения наследуемого признака, так и основной источник эволюционных изменений благодаря выгодным или разрушительным эффектам на молекулярном уровне. Мутации возникают в ответ на ряд факторов, в том числе

- ошибки репликации;
- повреждение ДНК, либо неправильно репарированной, либо оставленной без репарации;
- повреждение ДНК, вызванное внешними факторами, такими как химические вещества, ультрафиолетовый свет и ионизирующее излучение;
- эндогенные факторы, например активные формы кислорода, альдегиды или ошибки в ходе митоза;
- ферменты, участвующие в репарации ДНК или редактировании генома;
- вирусы и эндогенные ретротранспозоны, с помощью которых вставляют фрагменты ДНК.

Кроме того, сегодняшнее понимание заключается в том, что воздействие мутагена может вызывать многочисленные соматические мутации генов, большинство из которых без заметного селективного преимущества, но некоторые могут изменять ключевые клеточные функции. К тому же некоторые связанные с геномом свойства вероятно не являются мутационными, например эпигенетические изменения и модификации в клеточном микроокружении.

Традиционная селекция сельскохозяйственных культур предусматривала случайный мутагенез с последующим скринингом в отношении требуемого признака. К сожалению, существует недостаток эффективных способов скрининга для выявления заданных изменений генов, т.е. конкретных нуклеотидных замен в генах или регуляторных элементах подвергнутых мутагенезу организмов, например злаковых, без использования ГМ-способов. Действительно ГМ-растения обладают >10-летним конкурентным преимуществом в отношении целенаправленных подходов по развитию признаков как таковых и принятию более широким научным сообществом. Тем не менее, как упоминалось выше, ГМ-способы могут быть менее предпочтительными.

Результаты недавно разработанной методики секвенирования генома произвели революцию в понимании генетической архитектуры признаков (и соответствующих изменений в ответ на мутагенез). Например, широко распространено предположение, что секвенирование всего генома и новые вычислительные способы, которые дополняются масштабными высокопроизводительными попытками секвенирования гДНК, помогут ответить на несколько основных биологических вопросов и ускорить определение характеристик мутантов, например, при применении однодольного злакового растения ячмень.

Судя по всему, у эукариот для некоторых мутационных процессов характерно значительное варьирование в распределении по геному (Pleasance и соавт., 2010; Schuster-Böchlér и Lehner, 2012). Количество точечных мутаций варьирует по геному и, как правило, выше в участках последовательности с низкими уровнями экспрессии генов, репрессированного хроматина и на поздних периодах репликации. Некоторые из этих изменений могут быть вызваны ограниченным доступом механизма репарации ошибок в закрытых участках хроматина.

С учетом приведенной выше информации о состоянии предшествующего уровня техники специалисты в области исследования злаковых поймут, что аналитические достижения поставили исследование ячменя и злаковых на порог новых границ, особенно в переходной фазе научно-исследовательских работ между глубоким пониманием на уровне молекулярной биологии и промышленным применением растений с новыми характеристиками. Тем не менее несмотря на успехи в методиках секвенирования генома для выявления мутантов такие способы по-прежнему остаются времязатратными и сложными в материально-техническом отношении и мало полезны для выявления конкретных заданных мутаций.

Интересными остаются два дополнительных свойства не только в отношении выявления растений с заданными мутациями, но также и для усовершенствования их безопасности:

разграничение степени частоты мутаций зародышевой линии и соматических мутаций в злаках;

современные подходы фокусируются на сужении обнаружения мутантов до фрагментов гДНК на основе независимого от контекста анализа последовательности гДНК [например, метода TILLING, который ограничен скринингом максимум от 5000 до 10000 мутантов и различиями температур плавления между мутантными фрагментами гДНК и фрагментами гДНК дикого типа (Botticella и соавт., 2011)].

До сих пор считалось нереальным обнаружить заданные и сложные мутации с помощью не ГМ-способов. Также аналогично не было никаких рекомендаций о том, с какими размерами выборок необходимо работать, чтобы надежно выявить конкретные представляющие интерес нуклеотидные замены. Теперь это стало возможным с помощью последующего руководства, приведенного в настоящей публикации.

### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

В настоящем изобретении раскрыты способы поиска индивидуальных, развившихся традиционным путем организмов, имеющих заданную(ые) мутацию(и) по представляющим интерес нуклеотидам в одной или нескольких целевых последовательностях. Указанные мутации могут быть мутациями в генах, придающими конкретные полезные признаки.

В частности, основываясь на неожиданном новом понимании мутационных структур, настоящее изобретение относится к замечательному, но все еще относительно простому новому геномному способу для применения в поиске мутантных последовательностей. Настоящее изобретение относится к способам выявления организмов с заданной мутацией по одному или нескольким NOI. Заданной мутацией может быть любая требуемая мутация. Таким образом, настоящее изобретение относится к не ГМ-способам, которые позволяют выявлять организмы с определенными мутациями. Это стало возможным благодаря изобретательскому использованию ПЦР-методик, особенно цифровой ПЦР. Соответственно настоящее изобретение относится к новому подходу, который учитывает мутационный контекст ДНК для скрининга в сочетании с преимущественной с материально-технической точки зрения изобретательской системой, которая позволяет производить анализ гигантских коллекций мутантных организмов.

Также раскрыты новые, уменьшающие время и минимизирующие обработку действия для решения сложной задачи обнаружения редких мутаций, например мутаций, которые согласно ожиданиям должны локализоваться в вышеупомянутых закрытых участках хроматина ядер зерновых, в том числе ячменя. Доступ к полному геномным последовательностям можно использовать для разработки праймеров и/или зондов для способов. Так, можно использовать полную последовательность генома ячменя (сборку генома ячменя в Ensembl Plants, версия 082214v1) для конструирования праймеров и зондов для конкретных генов; она очень подходит для повышения скорости обнаружения растения с заданной мутацией.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к способам поиска посредством традиционной или общепринятой селекции заданных мутаций, которые, например, являются мутациями, приводящими к нуклеотидной замене в гене или генах, связанных с признаком у злакового. В раскрытых способах представлены подходы, помогающие прояснить лежащие в основе молекулярные механизмы, связанные с эндогенным и индуцированным мутагенезом.

Настоящее изобретение определено в прилагаемой формуле изобретения.

Настоящее изобретение относится к способам выявления организма предопределенного вида, несущего одну или несколько заданных мутаций по одному или нескольким NOI в целевой последовательности, причем указанный способ предусматривает следующие стадии:

- а) получение пула организмов указанного вида или их репродуктивных частей, представляющих множество генотипов;
- б) разделение указанного пула на один или несколько подпулов организмов или их репродуктивных частей;
- в) получение образцов гДНК, каждый из которых содержит гДНК от каждого генотипа в подпуле, при этом сохраняя потенциал для размножения организмов каждого генотипа в указанном подпуле;
- г) проведение множества ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает образец гДНК из одного подпула, причем каждая ПЦР-амплификация включает множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает часть указанного образца гДНК, набор праймеров, фланкирующих целевую последовательность, и реагенты для ПНР, тем самым амплифицируя целевую последовательность;
- е) детектирование продукта(ов) ПЦР-амплификаций, содержащего(их) одну или несколько целевых

последовательностей, содержащих представляющую(ие) интерес мутацию(и) по NOI, тем самым выявляя подпул(ы), содержащий(ие) указанную мутацию;

f) разделение организмов или их репродуктивных частей указанного выявленного подпула на вторичные подпулы;

g) получение образцов гДНК, каждый из которых содержит гДНК от каждого генотипа во вторичном подпуле, при этом сохраняя потенциал для размножения организмов каждого генотипа в указанном вторичном подпуле;

h) проведение множества ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает образец гДНК из одного вторичного подпула, набор(ы) праймеров, фланкирующий(ие) целевую последовательность, и реагенты для ПЦР, тем самым амплифицируя целевую последовательность;

i) детектирование продуктов ПЦР-амплификации, включающих целевую последовательность, содержащую заданную(ые) мутацию(и) по NOI, тем самым выявляя вторичные подпулы из стадии h), содержащие указанную мутацию;

j) выявление организма или его репродуктивной(ых) части(ей) в указанном вторичном подпуле, который/которая(ые) несет(ут) указанную(ые) мутацию(и).

Настоящее изобретение также относится к организмам, выявленным способами по настоящему изобретению. Например, настоящее изобретение относится к растению ячменя, несущему мутацию в гене HvGS1-3, кодирующем глутаминсинтазу, причем указанный мутантный ген кодирует мутантный белок HvGS1-3 с пониженной активностью.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано в настоящем документе в 5 последовательностях действий (WS), которые позволяют последовательно выявить конкретную, заданную нуклеотидную мутацию в коллекции мутантных зерен зерновых культур:

в подробном описании WS1 раскрыты процедуры создания коллекций традиционно индуцированных злаковых растений;

в детальном раскрытии WS2 описаны подробности о том, как структурировать сложные выборки зерен;

в WS3 показано, как выявить те выборки зерен, которые содержат мутантов;

в связанной с WS4 аналитике описано, как обнаружить отдельные мутантные зерна злаковых, и WS5 сфокусирована на том, как совместное применение двух различных инструментов на основе цифровой ПНР облегчает скрининг сверхвысоких количеств образцов гДНК, полученных из зерен злаковых.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 проиллюстрирован пример общей экспериментальной идеи по настоящей заявке.

На фиг. 2 проиллюстрирован пример общей экспериментальной идеи по настоящей заявке с применением ячменя в качестве примера вида растения.

(A) относится к размножению мутантных зерен ячменя (WS1, которая поясняется в подробном описании настоящего изобретения);

на (B) показаны аспекты создания упорядоченной библиотеки мутантных зерен (WS2, которая поясняется в подробном описании настоящего изобретения);

на (C) приведена сводная информация о том, как определить, содержит ли фракция зерен отдельные представляющие интерес зерна (WS3, которая поясняется в подробном описании настоящего изобретения);

(D) посвящена тому, как выявить в выборках со смесями зерен зерно с конкретной мутацией (WS4, которая поясняется в подробном описании настоящего изобретения);

на (E) приведена иллюстрация последовательности выполняемых действий, связанной с детектированием мутантной ДНК в образцах объединенной гДНК (WS5, которая поясняется в подробном описании настоящего изобретения).

#### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

**Определения.**

Термин "аллель" относится к конкретному варианту или состоянию гена. Применяемый в контексте настоящего документа термин "мутантный аллель" относится к гену, несущему одну или несколько заданных мутаций по одному или нескольким NOI. Если мутация представляет собой делецию всего гена, мутантный аллель также может быть аллелем, в котором отсутствует указанный ген.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "примерно" в отношении чисел обозначает  $\pm 10\%$ , предпочтительно  $\pm 5\%$ , например  $\pm 1\%$ .

Применяемый в контексте настоящего документа термин "блокирующий зонд" относится к олигонуклеотиду, который не может удлиняться на 3'-конце ДНК-полимеразой. Блокирующий зонд, как правило, будет представлять собой олигонуклеотид, который идентичен или комплементарен целевой последовательности, включая эталонный NOI, связанный с блокирующим средством, которое ингибирует удлинение блокирующего зонда ДНК-полимеразой.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "генотип" относится к организму, содержащему определенный набор генов. Таким образом, два организма, содержащие идентичные геномы, имеют один и тот же генотип. Генотип организма по отношению к определенному гену определяется

аллелями, которые несет указанный организм. У диплоидных организмов генотип отдельно взятого гена может быть AA (гомозиготным, доминантным) или Aa (гетерозиготным) или aa (гомозиготным, рецессивным).

Применяемый в контексте настоящего документа термин "зонд для детекции мутантной последовательности" относится к олигонуклеотиду, необязательно связанному с детектируемыми средствами, причем олигонуклеотид идентичен или комплементарен целевой последовательности, включая заданную мутацию NOI.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "ПЦР" обозначает полимеразную цепную реакцию. ПЦР представляет собой реакцию амплификации нуклеиновых кислот. Способ основан на термоциклировании и состоит из циклов повторного нагревания и охлаждения реакционной смеси для получения последовательного плавления и ферментативной репликации указанной ДНК. На первой стадии две цепи, образующие двойную спираль ДНК, физически разделяются при высокой температуре в процессе, также известном как плавление ДНК. На второй стадии температуру снижают, что делает возможной ферментативную репликацию ДНК. ПНР может также предусматривать инкубацию при дополнительной температуре для улучшения отжига праймеров и/или оптимизации температур(ы) для репликации. При ПНР температура обычно циклически изменяется между различными температурами в течение ряда циклов.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "реагенты для ПНР" относится к реагентам, которые добавляют к смеси для ПНР в дополнение к образцу и набору праймеров. К реагентам для ПНР относятся по меньшей мере нуклеотиды и полимеразы нуклеиновых кислот. Кроме того, к реагентам для ПНР можно отнести другие соединения, такие как соль(и) и буфер(ы).

Термин "ddPCR" обозначает капельную цифровую полимеразную цепную реакцию. При ddPCR проводят одну или несколько ПЦР-амплификаций, при этом каждая реакция разделена на множество капель эмульсии по типу "вода в масле", так чтобы в каждой отдельной капле могла проходить ПЦР-амплификация целевой последовательности.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "репродуктивное" относится как к половому, так и к бесполому репродуктивному. Таким образом, репродуктивное может представлять собой клональное размножение организма (также известное как "бесполое репродуктивное"). Репродуктивное также может представлять собой воспроизводство потомства организма, причем потомство содержит аллель(и) из родительского организма. Таким образом, репродуктивное организма, содержащего мутантный аллель, может относиться к воспроизводству потомства указанного организма, причем такое потомство содержит мутантный аллель. Предпочтительно мутантный аллель несет одну или несколько мутаций по одному или нескольким NOI.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "репродуктивные части организма" относится к любой части организма, которая при правильных условиях может вырасти в целый организм. В качестве примера в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, где вид представляет собой растение, репродуктивная часть указанного организма может быть, например, семенем, зерном или зародышем указанного растения. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения если вид представляет собой одноклеточный организм, то репродуктивные части представляют собой весь организм, т.е. одну клетку.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "набор праймеров, фланкирующих целевую последовательность", относится к набору из двух праймеров, фланкирующих целевую последовательность, так чтобы один праймер содержал последовательность, идентичную 5'-концу целевой последовательности (который также называют "прямым праймером"), и один праймер содержал последовательность, комплементарную 3'-концу целевой последовательности (который также называют "обратным праймером"). С помощью "набора праймеров" можно амплифицировать целевую последовательность при добавлении в смесь для ПЦР вместе с нуклеиновой кислотой, содержащей целевую последовательность, и реагентами для ПЦР в условиях, позволяющих проходить амплификации указанной целевой последовательности.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "целевая последовательность" относится к любой последовательности нуклеиновой кислоты, в которой необходимо создать или выявить мутацию. Кроме того, целевая последовательность предпочтительно представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть амплифицирована с помощью методики ПЦР с применением праймеров, фланкирующих целевую последовательность. Помимо того, целевая последовательность обычно содержит один или несколько NOI. Настоящее изобретение относится к способам получения и/или выявления организма(ов), несущих мутацию по указанному NOI. Целевая последовательность может, например, представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, связанную с конкретным признаком.

Применяемый в контексте настоящего документа термин "зонд для детекции эталонной последовательности" обозначает олигонуклеотид, необязательно связанный с детектируемыми средствами, причем олигонуклеотид идентичен или комплементарен целевой последовательности, включающей эталонный NOI. В целом целевая последовательность, включающая эталонный NOI, соответствует целевой после-

довательности до мутагенеза. "Зонд для детекции эталонной последовательности" также может называться "зондом для детекции последовательности дикого типа".

Применяемый в контексте настоящего документа термин "последовательность действий" (WS) обозначает серию из одной или нескольких стадий способа.

Способ выявления организма.

Настоящее изобретение относится к способам выявления организма predetermined вида, например, любого из видов, описанных в настоящем документе ниже в разделе "Виды", несущего мутацию по NOI в целевой последовательности [например, любую из мутаций, описанных в настоящем документе ниже в разделе "Представляющий(ие) интерес нуклеотид(ы)"], и при этом указанные способы включают стадии

а) получения пула организмов указанного predetermined вида или их репродуктивных частей, представляющих множество генотипов, например, любого из пулов, описанных в настоящем документе ниже в разделе "Пул организмов";

б) разделения указанного пула на один или несколько подпулов организмов или их репродуктивных частей, например, как описано в настоящем документе ниже в разделе "Разделение пула на подпулы";

с) получения образцов гДНК, каждый из которых содержит гДНК от каждого генотипа в подпуле, сохраняя при этом потенциал для размножения организмов каждого генотипа в указанном подпуле, что, например, можно выполнить так, как описано в настоящем документе ниже в разделе "Получение образцов ДНК";

д) проведения множества ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает образец гДНК из одного подпула, причем каждая ПЦР-амплификация включает множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает часть указанного образца гДНК, набор праймеров, фланкирующих целевую последовательность, и реагенты для ПЦР, тем самым амплифицируя целевую последовательность, что, например, можно выполнить так, как описано в настоящем документе ниже в разделе "ПЦР-амплификация, включающая множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций";

е) детектирования продукта(ов) ПЦР-амплификаций, содержащего(их) целевую последовательность, содержащую мутацию(и) по одному или нескольким NOI, тем самым выявляя подпул(ы), содержащий(е) указанную мутацию, что, например, можно выполнить так, как описано в настоящем документе ниже в разделе "Детектирование продукта(ов) ПЦР-амплификаций";

ф) разделения организмов или их репродуктивных частей указанного выявленного подпула на вторичные подпулы, например, так, как описано в настоящем документе ниже в разделе "Разделение подпула на вторичные подпулы";

г) получения образцов гДНК, каждый из которых содержит геномную ДНК от каждого генотипа во вторичном подпуле, сохраняя при этом потенциал для размножения организмов каждого генотипа в указанном вторичном подпуле, что, например, можно выполнить так, как описано в разделе "Получение образца ДНК";

h) проведения множества ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает образец гДНК из одного вторичного подпула, набор(ы) праймеров, фланкирующий(ие) целевую последовательность, и реагенты для ПЦР, тем самым амплифицируя целевую последовательность, что, например, можно выполнить так, как описано в разделе "Выявление вторичных подпулов";

i) детектирования ПЦР-амплификации(ий), содержащей(их) целевую последовательность, содержащую мутацию(и) по одному или нескольким NOI, тем самым выявляя вторичные подпулы, содержащие указанную мутацию, что, например, может быть выполнено так, как описано в разделе "Выявление вторичных подпулов";

j) выявления организма в указанном вторичном подпуле, несущего указанную мутацию, что, например, можно выполнить так, как описано в разделе "Выявление организма".

Стадия а) может, например, предусматривать получение пула организмов, полученных так, как описано в настоящем документе в WS1.

Стадию б), например, можно выполнить так, как описано в настоящем документе в WS2.

Стадии с), d) и е), например, можно выполнить так, как описано в настоящем документе в WS3.

Стадии f), g), h), i) и j), например, можно выполнить так, как описано в настоящем документе в WS4.

Реагенты для ПЦР обычно содержат по меньшей мере нуклеотиды и полимеразу нуклеиновой кислоты. Кроме того, реагенты для ПЦР также предпочтительно могут содержать один или несколько зондов для детекции, например зонд для детекции мутации и/или зонд для детекции эталонной последовательности, которые описаны в настоящем документе выше в разделе "Детектирование продукта(ов) ПЦР".

Помимо описанных выше стадий, способы по настоящему изобретению могут предусматривать одну или несколько дополнительных стадий. Способы могут, например, предусматривать стадию получения указанного пула организмов, например, путем мутагенеза. Способы получения пула организмов описаны в настоящем документе ниже в разделе "Пул организмов".

Способы могут также предусматривать стадию репродукции одного или нескольких из ука-

занных организмов или их репродуктивных частей в пуле или в подпуле организмов или их репродуктивной(ых) части(ей). Указанная стадия репродукции в случае простых организмов, например одноклеточных организмов, которые репродуцируются бесполом путем, может включать одно или несколько клеточных делений. В случае более сложных организмов, например организмов, репродуцирующихся половым путем, эта стадия может включать культивирование указанных организмов или их репродуктивных частей в течение одного или нескольких циклов.

В дальнейшем ссылка делают просто на "организм". Тем не менее те же соображения применимы к способам с применением репродуктивных частей организмов.

Каждая стадия культивирования организма может привести к получению потомства, которое не идентично исходному организму. Например, после случайного мутагенеза полиплоидных организмов большинство организмов будут нести любую случайную мутацию лишь на одном аллеле и, таким образом, будут генетически гетерозиготными по такой мутации. Обычно организмы потомков включают организмы без мутации, генетически гетерозиготные по мутации организмы-потомки и генетически гомозиготные по мутации организмы-потомки. Таким образом, пул потомства исходного пула или организмов или их репродуктивных частей не будет идентичен исходному пулу, но, как правило, по меньшей мере будет представлять любую мутацию по одному или нескольким NOI, присутствующим в исходном пуле либо гетерозиготных, и/либо гомозиготных организмов. Таким образом, по меньшей мере, часть указанного потомства будет содержать мутантный аллель. Точно так же потомство подпула, суперпула или вторичного подпула может не быть идентичным исходному подпулу, суперпулу или вторичному подпулу, но в целом, по меньшей мере, будет представлять любую мутацию по одному или нескольким NOI, присутствующим в исходном подпуле, суперпуле или вторичном подпуле в форме либо гетерозигот, либо гомозигот.

Стадия b) разделения пула на еще несколько подпулов может, таким образом, предусматривать этап репродукции организмов или их репродуктивных частей. Это можно выполнить, например, одновременно с разделением пула на подпулы. В качестве альтернативы это можно осуществить после разделения пула на подпулы. Таким образом, способы по настоящему изобретению могут после стадии b) предусматривать стадию репродукции организмов или их репродуктивных частей в пределах указанных подпулов.

Аналогичным образом способы по настоящему изобретению могут после стадии b) предусматривать стадию репродукции организмов или их репродуктивных частей в пределах указанных вторичных подпулов. Тем не менее в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения и, в частности, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, где вид представляет собой растение, такое как злаковое, может быть предпочтительным, чтобы способы не предусматривали между стадиями f) и g) стадию репродукции организмов или их репродуктивных частей вторичных подпулов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения способы предусматривают стадию репродукции организмов или их репродуктивных частей, содержащихся во вторичном подпуле, содержащем мутацию по NOI. Указанную стадию можно выполнять в любой подходящий момент, например, между стадиями i) и j), как описано выше.

Способы могут также предусматривать стадию выявления группы подпулов, содержащих мутацию по NOI. Указанную стадию можно выполнять в любой подходящий момент, но зачастую ее выполняют после стадии c) описанных выше способов, и можно, например, выполнять так, как описано в настоящем документе ниже в разделе "Суперпулы".

В соответствии с одним вариантом осуществления способы по настоящему изобретению могут быть сведены в 4-5 отдельных последовательностей действий, например WS1-WS5, каждая из которых разделена на ряд отдельных "стадий", как описано ниже. Несмотря на то что предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения представляют способы, предусматривающие или даже состоящие из WS1-WS5, настоящее изобретение не ограничено способами, предусматривающими эти WS. Например, способы по настоящему изобретению могут предусматривать только WS2-WS5 и не предусматривать WS1. Такой способ, например, проиллюстрирован на фиг. 1. Пример способа, предусматривающего WS1-WS5, дополнительно проиллюстрирован на фиг. 2, разделенной на 5 частей, где

фиг. 2A относится к конкретному примеру WS1 в варианте осуществления настоящего изобретения, где видом является ячмень; на фигуре проиллюстрировано размножение мутантных зерен ячменя, как подробно описано в настоящем документе в WS1;

на фиг. 2B показан пример аспектов создания упорядоченной библиотеки мутантных зерен, как подробно описано в настоящем документе в WS2 (ср. пример 1 и 2);

на фиг. 2C представлен пример обобщенной схемы, как определить, содержит ли фракция "всего зерен" зерно(а), характеризующее(ие)ся мутацией по NOI, как подробно описано в настоящем документе в WS3 (ср. пример 3-7);

на фиг. 2D показан пример WS4, т.е. показаны процедуры определения того, какое из зерен во фракции "всего зерен", при этом указанная фракция ранее показана как содержащая зерна, содержащие мутацию(и) по одному или нескольким NOI, ср. фиг. 2C, несет мутацию по одному или нескольким NOI,

как подробно описано на стадии 4 в настоящем документе (ср. 8-15);

на фиг. 2Е представлен пример обзора процедур в WS5, в которых используют технологию компартиментализированной ПНР (например, ddPCR) для определения тех "суперпулов" гДНК, т.е. объединенных аликуот образцов гДНК (пример 17), которые содержат мутацию, соответствующую мутации по NOI.

Представляющий интерес нуклеотид (NOI).

Настоящее изобретение относится к способам выявления одного или нескольких организмов, несущих мутацию(и) по одному или нескольким представляющим интерес нуклеотидам. В частности, такие способы позволяют выявить организм(ы), несущий(е) одну или несколько predetermined мутаций по одному или нескольким NOI. Соответственно способ позволяет выявить организм, несущий конкретную мутацию, при этом все еще имея в основе не ГМ-способы.

Мутация может представлять собой любую мутацию, причем указанные один или несколько представляющих интерес NOI отличаются от соответствующего(их) NOI в эталонной последовательности. Зачастую эталонная последовательность представляет собой последовательность дикого типа. Тем не менее эталонная последовательность также может быть любой другой последовательностью.

Мутация может представлять собой мутацию любого типа, например делецию, вставку, замену или смесь вышеупомянутых.

NOI может представлять собой один нуклеотид или несколько нуклеотидов, и, таким образом, NOI может состоять по меньшей мере из одного, к примеру 1, например 2, к примеру 3, например 4, к примеру 5, например 6, к примеру 7, например 8, к примеру 9, например 10, к примеру от 10 до 20, например от 20 до 50, к примеру более 50 нуклеотидов.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения NOI состоит из одного нуклеотида; в этом случае, например, мутация может представлять собой замену одного нуклеотида. Такие мутации также известны как точечные мутации.

В соответствии с другими вариантами осуществления настоящего изобретения мутация может представлять собой делецию указанного NOI. В соответствии с другими вариантами осуществления мутация может представлять собой вставку одного или нескольких нуклеотидов между двумя представляющими интерес нуклеотидами.

В соответствии с одним вариантом осуществления, эталонная последовательность представляет собой последовательность дикого типа, т.е. наиболее часто встречающуюся в природе последовательность, а мутация, следовательно, представляет собой мутацию относительно указанной последовательности дикого типа.

В соответствии с одним вариантом осуществления мутация может быть связана с требуемым признаком в указанном виде. В зависимости от типа вида требуемый признак может быть выбран из множества различных признаков. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, в которых вид представляет собой окультуренное растение, указанным признаком может быть, например, повышенная жизнеспособность, усиленная устойчивость к различным факторам окружающей среды, усиленный рост или более высокая урожайность. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, в которых вид представляет собой растение, применяемое для производства продукта питания, корма или напитка, этот признак также может относиться к повышенной пищевой ценности, улучшенным вкусовым свойствам, улучшенным свойствам хранения или повышенной полезности для производства указанного продукта питания, корма или напитка.

NOI может быть расположен в любой целевой последовательности в любой нуклеиновой кислоте. Зачастую целевая последовательность является частью последовательности гДНК. Более предпочтительно целевая последовательность является частью последовательности гДНК. Таким образом, мутация может представлять собой мутацию гДНК указанного организма. NOI может быть расположен в любой части гДНК как в кодирующем, так и в не кодирующем участках. Зачастую NOI может быть расположен в любой части гена, например в кодирующем участке (например, в экзоне), в интроне или в регуляторных участках гена, например в промоторах, терминаторах и/или интронах.

Виды.

Способы по настоящему изобретению предусматривают выявление организма predetermined вида. Виды могут представлять собой любые виды, включая как многоклеточные, так и одноклеточные организмы. Например, вид может представлять собой вид, содержащийся в "Open Tree of Life (Открытое дерево жизни)", например справочной таксономии Open Tree of Life версии 2.9, вариант 12, от 12 октября 2015 г.

Вид может быть прокариотическим видом, таким как бактерия. Примеры бактерий включают бактерии, применяемые в производстве пищевого продукта, например бактерии рода, выбранного из группы, состоящей из *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Alactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Carnobacterium*, *Corynebacterium*; *Enterococcus*, *Gluconacetobacter*, *Hafnia*, *Halomonas*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Macroccoccus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Tetragenococcus*, *Weissella* и *Zymomonas*.



Вид также может быть эукариотическим видом, например, выбранным из группы, состоящей из грибов, водорослей, растений и животных.

В соответствии с одним вариантом осуществления вид выбран из группы, состоящей из грибов. Таким образом, вид может быть одноклеточным или многоклеточным организмом. Например, вид может быть грибом рода, выбранного из группы, состоящей из *Aspergillus*, *Candida*, *Cystofilobasidium*, *Cyberlindnera*, *Debaryomyces*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Issatchenkia*, *Kazachstania*, *Kloeckera*, *Klyveromyces*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Pichia*, *Rhizopus*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Torulopsis*, *Thrichosporon*, *Verticillium*, *Yarrowia* и *Zygorhizopus*.

В частности, вид может представлять собой дрожжи, такие как дрожжи, выбранные из группы, состоящей из *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces bayanus* и *Saccharomyces uvarum*. К другим представляющим интерес дрожжам относятся виды *Brettanomyces* и т.п.

В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения вид представляет собой растение. Указанное растение может представлять собой зеленое растение, например, растение, выбранное из группы, состоящей из цветковых растений, хвойных деревьев, голосеменных, папоротников, плаунообразных, антоцервовых, печеночников, мхов и зеленых водорослей. Растение может быть, например, однодольным или двудольным.

В частности, растение может быть окультуренным растением. Указанное окультуренное растение может представлять собой любое растение, культивируемое человеком, например, в качестве источника пищи, корма или в качестве сырья для производства товаров или в эстетических целях.

В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения вид представляет собой злаковое растение. Применяемое в контексте настоящего документа "злаковое" является членом семейства растений *Graminae*, культивируемых в основном за их содержащие крахмал семена или зерна. Злаки включают без ограничения ячмень (*Hordeum*), пшеницу (*Triticum*), рис (*Oryza*), кукурузу (*Zea*), рожь (*Secale*), овес (*Avena*), сорго (*Sorghum*) и гибрид пшеница-рожь под названием тритикале.

Растение также может быть другими окультуренными растениями, в том числе томатами.

Как упомянуто выше, вид также может быть животным, например домашним животным, таким как животное, выбранное из группы, состоящей из коровы, курицы, свиньи, овцы, козы, верблюда, лошади, индейки, утки и кролика.

Пул организмов.

Способы по настоящему изобретению предусматривают получение пула организмов заданного вида, представляющего множество генотипов. Указанные виды могут, например, представлять собой любой из видов, описанных в настоящем документе выше в разделе "Виды".

Таким образом, пул организмов состоит из множества организмов, которые принадлежат к одному и тому же виду, но представляют различные генотипы указанного вида. Пул может содержать более одного организма каждого генотипа. Однако пул должен содержать множество организмов различных генотипов. Предпочтительно пул содержит по меньшей мере 100, более предпочтительно по меньшей мере 1000, еще более предпочтительно по меньшей мере 5000, еще более предпочтительно по меньшей мере 10000, еще более предпочтительно по меньшей мере 50000, еще более предпочтительно по меньшей мере 100000, например по меньшей мере 500000, к примеру по меньшей мере 1000000 организмов или их репродуктивных частей с различными генотипами.

Предпочтительно, чтобы пул организмов содержал достаточное количество организмов или их репродуктивных частей с различными генотипами, так чтобы пул теоретически мог содержать все возможные мутации во всех генах указанного организма. Например, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если видом является ячмень, полагают, что пул, содержащий ~500000 подвергнутых случайному мутагенезу зерен ячменя, теоретически будет содержать все возможные мутации во всех генах указанного ячменя (исходя из предположения ~10000 одноосновных мутаций в одном зерне, подвергнутого мутагенезу посредством 1 mM NaN<sub>3</sub>). Для повышения эффективности способов по настоящему изобретению пул может содержать по меньшей мере в 2 раза, к примеру по меньшей мере в 3 раза больше организмов или их репродуктивных частей с различными генотипами, чем ожидали теоретически, для того чтобы он содержал все возможные мутации. Таким образом, пул организмов может содержать, по меньшей мере 500000, к примеру по меньшей мере 1000000, например по меньшей мере 1500000 организмов или их репродуктивных частей с различными генотипами. Это может, например, иметь место в вариантах осуществления, где рассматриваемым видом является ячмень.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пул может содержать по меньшей мере 30000 организмов или их репродуктивных частей с различными генотипами, к примеру, в диапазоне от 30000 до 500000.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пул организмов может содержать по меньшей мере 5000000, к примеру, в диапазоне от 1000000 до 100000000 организмов или их репродуктивных частей с различными генотипами. Это может, например, иметь место в вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых организм представляет собой небольшой организм, например одноклеточный организм.

В соответствии с другими вариантами осуществления пул может содержать в диапазоне от 100000 до 500000 организмов или их репродуктивных частей с различными генотипами. Это может, например, иметь место в вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых организм представляет собой одноклеточный организм.

Одним из преимуществ способов по настоящему изобретению является то, что данные способы позволяют проводить скрининг большого количества организмов различных генотипов. Таким образом, пул организмов может содержать очень большое количество организмов различных генотипов. Кроме того, способы по настоящему изобретению могут позволить выявить организм с заданной мутацией по любому NOI. Для того чтобы иметь возможность выявить организм с мутацией по любому NOI, может потребоваться, чтобы пул организмов содержал большое количество различных генотипов, такое как вышеупомянутое количество различных генотипов.

Пул организмов можно получить любым пригодным способом.

В соответствии с одним вариантом осуществления пул организмов получают путем сбора отдельных организмов. Это можно осуществить, например, из банков семян (при условии, что вид является растением), из коллекций клеток (при условии, что вид является одноклеточным организмом) или из коллекций других организмов. Это также можно осуществить путем сбора отдельных организмов или образцов указанных организмов любым другим способом.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения пул организмов получают посредством мутагенеза, в частности случайного мутагенеза. Таким образом, для получения пула организмов можно подвергнуть мутагенезу множество организмов. Указанный мутагенез, в частности, может быть случайным мутагенезом, который, например, можно выполнять так, как описано ниже.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если организм представляет собой одноклеточный организм, тогда обычно случайному мутагенезу подвергают множество интактных организмов.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если вид представляет собой многоклеточный организм, может быть достаточным подвергнуть указанному случайному мутагенезу репродуктивную часть указанного многоклеточного организма. В соответствии с такими вариантами осуществления, случайному мутагенезу подвергают либо множество организмов, либо множество репродуктивных частей организмов, либо их смесь.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если вид представляет собой растение, тогда указанный пул может содержать множество семян, которые представляют множество генотипов. Таким образом, пул может содержать множество семян, которые были подвергнуты мутагенезу. Однако пул также может содержать потомство семян, которые были подвергнуты мутагенезу.

В настоящем документе семена (например, зерна злаковых), которые были подвергнуты мутагенезу, могут называться поколением МО. Указанные семена, например зерна злаковых, можно посеять и дать развиться в зрелые растения, семена (например, зерна злаковых) которых считают поколением М1. Семена поколения М1 можно посеять и дать вырасти в зрелые растения, семена которых считают поколением М2 и т.д. Этот принцип показан на фиг. 2А.

Пул организмов может содержать семена, например зерна злаковых, любого из вышеупомянутых поколений. Таким образом, пул не обязательно содержит семена, ранее подвергнутые прямому мутагенезу. Пул организмов может также содержать семена, например зерна злаковых, поколения М1, М2 или М3.

Указанный случайный мутагенез можно осуществить любым пригодным способом, например облучением или химической обработкой. Облучение может представлять собой УФ-облучение, рентгеновское облучение или радиоактивное облучение. Химический мутагенез можно представлять собой обработку любым мутагенным химическим веществом, например химическим веществом, выбранным из группы, состоящей из азидов натрия ( $\text{NaN}_3$ ), таких алкилирующих средств, как N-этил-N-нитрозомочевина (ENU), метилнитрозогуанидин (MNNG) и этилметансульфонат (EMS), или алкилирующих средств, которые указаны ниже. Для создания случайных мутантов зачастую применяют  $\text{NaN}_3$ , ENU и EMS. Для получения подвергнутых случайному мутагенезу дрожжевых культур зачастую применяют MNNG и EMS.

Для индукции случайных мутаций в гДНК растения зерна или регенерируемые растительные ткани растения можно обработать мутагеном или смесью мутагенов, включая без ограничения алкилирующие средства, такие как сульфонаты, например этилметансульфонат (EMS), диэтилсульфонат (DES); сернистые иприты, например этил-2-хлорэтилсульфид; азотистые иприты, например 2-хлорэтилдиметиламин, и эпоксиды, например этиленоксид. К числу других относятся этиленмин, гидроксилламин ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ), N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (MNNG),  $\text{NaN}_3$  и диазометан. Для создания организмов-потомков обработанные ткани или зерна затем можно размножить. Такой случайный мутагенез можно применять с такими растениями, как сельскохозяйственные растения, включая злаки, без ограничения пшеницу, кукурузу, рис, сорго и просо, и двудольные растения, включая без ограничения рапс, хлопчатник, сою и свеклу.

Способы по настоящему изобретению не ограничены каким-либо конкретным типом мутагенеза. Таким образом, можно применять мутагенез любого типа, такой как любая форма случайного мутагенеза.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения пул организмов можно получить так, как описано в настоящем документе ниже в разделе "WS1" в примерах. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если видом является ячмень, пул организмов можно получить так, как описано в настоящем документе ниже в разделе "WS1" в примерах в отношении ячменя. Специалист в настоящей области техники сможет адаптировать описанные в WS1 способы для применения с другими цветковыми растениями, в том числе с другими злаковыми растениями. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если видом являются дрожжи, пул организмов можно получить так, как описано в настоящем документе ниже в разделе "WS1" в примерах в отношении дрожжей. Специалист в настоящей области техники сможет адаптировать описанные в WS1 способы для применения с другими одноклеточными организмами.

Разделение пула организмов на подпулы.

Способы по настоящему изобретению предусматривают стадию разделения пула организмов на один или несколько подпулов, причем каждый подпул содержит множество организмов или их репродуктивных частей. Предпочтительно каждый подпул содержит множество организмов или их репродуктивных частей, представляющих множество генотипов.

Обычно пул делят на множество подпулов, предпочтительно по меньшей мере на 5 подпулов, более предпочтительно по меньшей мере на 10 подпулов, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30 подпулов, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50 подпулов, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70 подпулов, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90 подпулов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пул делят по меньшей мере на 500, например по меньшей мере на 1000, например по меньшей мере на 1500 подпулов. Это может, в частности, иметь место в вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых пул содержит большое количество организмов с различным генотипом.

В принципе не существует верхнего предела для количества подпулов. Однако, как правило, пул делят не более чем на 50000, например не более чем на 25000, например не более чем на 10000 подпулов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пул делят на 90-500 подпулов.

Каждый подпул предпочтительно содержит множество организмов или их репродуктивных частей, представляющих множество генотипов. Предпочтительно каждый подпул содержит по меньшей мере 10, более предпочтительно по меньшей мере 100, еще более предпочтительно по меньшей мере 500, еще более предпочтительно по меньшей мере 1000, еще более предпочтительно по меньшей мере 5000, еще более предпочтительно по меньшей мере 10000, например по меньшей мере 50000, к примеру по меньшей мере 100000 организмов или их репродуктивных частей с различными генотипами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждый подпул может содержать по меньшей мере от 2000 до 10000, к примеру в диапазоне от 3000 до 5000 организмов или их репродуктивных частей с различными генотипами.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каждый подпул содержит от 1000 до 2000 организмов или их репродуктивных частей, представляющих различные генотипы.

Подпулы можно упорядочивать любым необходимым способом. Если пул содержит множество организмов одного и того же генотипа, предпочтительно, чтобы большинство организмов или даже все организмы одного и того же генотипа содержались в одном и том же подпуле. Это можно обеспечить множеством способов в зависимости от вида, например, как описано ниже. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, в которых пул организмов или их репродуктивных частей получают с помощью случайного мутагенеза, может быть предпочтительным, чтобы указанный пул был разделен таким образом, чтобы все потомство одних организмов из указанного пула или их репродуктивной части содержалось в одном подпуле.

Например, пул можно разделить на подпулы, а указанные подпулы можно подвергнуть стадии репродукции. Также возможно, чтобы стадию воспроизведения выполняли одновременно со стадией разделения пула на подпулы таким образом, чтобы обеспечить попадание потомства одного организма или его репродуктивной части в один и тот же подпул.

Также предпочтительно, чтобы каждый подпул содержал более одного организма или его репродуктивной части каждого генотипа. Это можно обеспечить различными способами. Например, подпулы можно подвергнуть стадии репродукции, обеспечивающей получение потомства каждого организма или его репродуктивной части в упомянутом подпуле. В частности, предпочтительно, чтобы каждый подпул содержал достаточное количество организмов каждого генотипа для того, чтобы случайным образом разделить подпул на 2, 3 или 4 части таким образом, чтобы каждая часть теоретически содержала организмы (или их репродуктивные части), представляющие каждый генотип подпула. Таким образом, предпочтительно, чтобы каждый подпул содержал по меньшей мере 5, предпочтительно по меньшей мере 10, еще более предпочтительно по меньшей мере 15 организмов, представляющих каждый генотип. Это может, в частности, иметь место в вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых вид

является растением, например, злаковым. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если вид представляет собой одноклеточный организм, тогда может быть предпочтительным, чтобы каждый подпул содержал намного больше организмов каждого генотипа, например по меньшей мере 100, к примеру по меньшей мере 1000, например по меньшей мере 10000.

Пример способа разделения пула на подпулы представлен на фиг. 1А.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если вид представляет собой одноклеточный организм, а пул получают путем мутагенеза множества одноклеточных организмов, подпулы можно получить, например, следующим образом:

после мутагенеза каждому одноклеточному организму позволяют отдельно размножиться, так чтобы каждый одноклеточный организм развивался в клональную культуру. Это можно осуществить путем культивирования колоний каждого клона на твердой среде или путем культивирования каждого клона в отдельных пространствах, например в пробирках или лунках, с жидкой средой. Подпул можно сформировать путем объединения одноклеточных организмов из множества клонов;

одноклеточные организмы можно разделить на подпулы сразу после мутагенеза, и каждому подпулу можно позволить репродуцироваться.

Таким образом, способы могут предусматривать стадии  
получения множества одноклеточных организмов, например дрожжей;  
случайного мутагенеза указанных организмов;  
разделения подвергнутых мутагенезу организмов на подпулы;  
проведения с каждым из подпулов стадии репродуцирования.

Указанная стадия репродуцирования может предусматривать инкубирование каждого подпула в среде для культивирования в условиях, которые обеспечивают рост указанного организма. Например, стадия может предусматривать инкубирование подпулов в среде для культивирования в течение промежутка времени 1 до 5 дней при температуре, обеспечивающей рост указанного организма.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если вид представляет собой растение, подпул можно получить таким образом, чтобы все семена одного конкретного растения содержались в одном подпуле. Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения, способы предусматривают стадии

получения множества семян растения, например зерен злаковых;  
мутагенеза указанных семян с получением таким образом семян поколения M0;  
выращивания указанных семян поколения M0 в зрелые растения и получения семян из указанных зрелых растений, причем указанные семена являются семенами поколения M1;  
необязательно повторения предыдущей стадии X раз для получения растений, содержащих семена поколения M(1+X);  
получения семян либо поколения M1, либо поколения M(1+X) из указанных зрелых растений с получением и, таким образом, пула семян (например, пула зерен злаковых);  
разделения указанного пула на подпулы, причем все семена (например, зерна злаковых) из данного зрелого растения помещают в один и тот же подпул.

Эти стадии проиллюстрированы на фиг. 2А и 2В с применением ячменя в качестве примера. Способ может предусматривать стадии, проиллюстрированные на фиг. 2А и 2В. Стадии, проиллюстрированные на фиг. 2А и 2В, можно выполнять с применением любого цветкового растения, таким образом не ограничиваясь ячменем. Кроме того, стадии, показанные на фиг. 2А и 2В, можно выполнять с применением любого количества мутантных растений (числа, представленные на фигуре, являются просто примером).

Соответственно способ может предусматривать стадии  
получения множества семян растения, например зерен злаковых;  
мутагенеза указанных семян с получением таким образом семян поколения M0;  
необязательно культивирования указанных семян поколения M0 в зрелые растения и получения семян из указанных зрелых растений, причем указанные семена являются семенами поколения M1;  
необязательно повторения предыдущей стадии X раз для получения растений, содержащих семена поколения M(1+X);

культивирования семян поколения M0, M1 или M(1+X) на отдельных полевых участках в зрелые растения, причем семена указанных зрелых растений составляют пул семян;

разделения указанных площадей на полевые подучастки;  
сбора всех семян всех растений в пределах одного полевого подучастка, таким образом получая подпул семян (например, подпул зерен злаковых), который можно обозначить как "все зерно" (ср. фиг. 2В).

Вместо культивирования семян на полевых участках их можно культивировать любым пригодным способом, позволяющим разделить растения на подгруппы, таким образом получая подпулы. Например, семена можно культивировать в отдельных емкостях, каждая из которых содержит одно или несколько растений. Семена также можно культивировать в теплице.

Один пример способа разделения пула на подпул описан в настоящем документе ниже в WS2.

Выявление подпулов.

Способы по настоящему изобретению предусматривают стадии разделения пула организмов или их репродуктивных частей на подпулы. За этим следует стадия выявления подпула, содержащего организм или его репродуктивные части, содержащие мутацию(и) по одному или нескольким NOI.

Выявление указанного подпула может предусматривать стадии

а) получения образцов гДНК, каждый из которых содержит гДНК от каждого генотипа в пределах одного подпула, что, например, можно выполнить так, как описано в настоящем документе ниже в разделе "Получение образцов ДНК";

б) проведения множества ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций, что, например, можно выполнить так, как описано в настоящем документе ниже в разделе "ПЦР-амплификация, включающая множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций";

с) детектирования продукта(ов) ПЦР-амплификаций, содержащего(их) представляющую(ие) интерес мутацию(и) по одному или нескольким NOI, тем самым выявляя указанны(ые) подпул(ы), что, например, можно выполнить так, как описано в настоящем документе ниже в разделе "Детектирование продукта(ов) ПЦР-амплификаций".

Подпул можно непосредственно выявить, например, при условии, что продукт(ы) ПЦР-амплификации содержит(ат) мутацию(и) по одному или нескольким NOI, которую(ые) можно непосредственно детектировать после или во время ПЦР-амплификации. Это можно, например, выполнить, если продукт(ы) ПЦР-амплификации содержит(ат) средство детекции, которое подает один или несколько детектируемых сигналов, при условии, что продукт(ы) ПЦР-амплификации содержит(ат) целевую(ые) последовательность(и), содержащую(ие) мутацию(и) по одному или нескольким NOI. Такие средства детекции более подробно описаны ниже в разделе "Детектирование продукта(ов) ПЦР-амплификации" и могут представлять собой, например, зонды для детекции мутаций.

Один пример способа выявления подпула, содержащего одну или несколько конкретных мутаций, показан на фиг. 1В с выделением следующих стадий:

получение подпула;

получение выборки из части указанного подпула;

получение образца гДНК из указанного образца;

проведение ПЦР-амплификаций со всеми отдельными образцами гДНК от всех подпулов, например, в отдельных лунках планшета, например в микротитровальных планшетах;

отбор тех образцов, которые содержат мутацию(и) по одному или нескольким NOI.

Более конкретный пример способа выявления подпула показан на фиг. 2С. В этом примере вид относится к группе злаковых растений. Конкретные числа, приведенные на фиг. 2С, являются только примерами, и специалист в настоящей области техники поймет, что способ можно выполнить с применением другого количества зерен. Например, выявление подпула, содержащего мутацию по NOI, можно выполнить так, как описано в настоящем документе ниже в WS3.

Получение образцов ДНК.

Способы по настоящему изобретению предусматривают одну или несколько стадий получения образцов ДНК, в частности, образцов гДНК. В частности, способы могут предусматривать одну стадию получения образцов гДНК из подпула и одну стадию получения образцов гДНК из вторичного подпула. Способы также могут предусматривать стадию получения образцов кДНК из суперпула.

Как правило, указанные образцы гДНК получают таким образом, чтобы образец гДНК теоретически содержал гДНК от каждого генотипа в подпуле, вторичном подпуле или суперпуле, сохраняя при этом потенциал для репродуцирования организмов каждого генотипа в пределах указанного подпула, вторичного подпула или суперпула.

Это можно обеспечить различными способами. Например, может быть предпочтительным, чтобы каждый подпул и суперпул содержали более одного отдельного организма или его репродуктивных частей каждого генотипа. В частности, может быть предпочтительным, чтобы каждый подпул или суперпул содержал достаточное количество организмов каждого генотипа, чтобы случайным образом разделить подпул или суперпул на 2, 3 или 4 части таким образом, чтобы каждая часть в теории содержала организмы или их репродуктивные части, представляющие каждый генотип подпула или суперпула.

Таким образом, для получения образца гДНК можно применять часть организмов или их репродуктивных частей из подпула или суперпула, например, в диапазоне от 10 до 90%, предпочтительно в диапазоне от 10 до 50%, к примеру в диапазоне от 25 до 50% организмов или их репродуктивных частей каждого подпула или каждого суперпула. Указанную часть организмов или их репродуктивных частей в настоящем документе также называют "выборкой организмов". Остальную часть организмов из подпула можно хранить в условиях, сохраняющих репродуктивный потенциал указанных организмов или их репродуктивных частей. В соответствии с вариантами осуществления, если организм представляет собой растение, может быть достаточно хранить семена указанных растений. Семена, например зерна злаковых, зачастую можно хранить в любом сухом и темном месте. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если организм представляет собой одноклеточный организм, может быть

предпочтительным заморозить указанный организм, например, в присутствии криопротектора, такого как глицерин.

Аналогично каждый указанный вторичный подпул может содержать более одного отдельного организма или его репродуктивных частей каждого генотипа. Таким образом, для получения образца гДНК можно применять часть организмов или их репродуктивных частей из вторичного подпула, например, в диапазоне от 10 до 90%, предпочтительно в диапазоне от 40 до 60%, к примеру в диапазоне от 25 до 50%, организмов или их репродуктивных частей каждого вторичного подпула. Однако в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в частности, если вид представляет собой более крупный организм, может быть предпочтительным, чтобы образец гДНК вторичного подпула был получен из образца части каждого организма или его репродуктивной части, как описано ниже.

В настоящем изобретении также предусматривают, что образец гДНК можно получить из образца, полученного от каждого организма или его репродуктивной части из подпула, вторичного подпула или суперпула. Например, в настоящем изобретении предусматривают, что каждый подпул, суперпул и вторичный подпул может содержать только один или несколько организмов или их репродуктивных частей каждого генотипа. В соответствии с такими вариантами осуществления образец гДНК можно получить из образца, полученного от каждого организма или его репродуктивной части. Как правило, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения получить образец от каждого организма можно только, если вид имеет размер, достаточный для получения такого образца. Это может, в частности, быть уместным в вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых вид является животным или растением, таким как цветковое растение.

Тогда как подпул и суперпул предпочтительно содержат несколько отдельных организмов или их репродуктивных частей каждого генотипа, как отмечено в других разделах настоящего документа, вторичный подпул зачастую может содержать лишь несколько, а иногда всего лишь один отдельный организм или его репродуктивную часть каждого генотипа. Таким образом, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если вид представляет собой растение (например, злаковое), предпочтительно, чтобы образец гДНК из вторичного подпула получали путем получения образца каждого отдельного организма и получения образцов гДНК из указанных образцов.

Когда образцы получают от каждого организма или его репродуктивных частей, предпочтительно, чтобы образцы получали способом, не наносящим значительного ущерба указанным организмам или их репродуктивным частям с точки зрения потенциала репродукции. Таким образом, предпочтительно, образец содержит часть организма или его репродуктивную часть или состоит из нее, которая не является необходимой для размножения. Образец можно получить любым пригодным способом в зависимости от вида, например, с помощью биопсии, отсечения, высверливания, просеивания, отрывания или применения шприца, снабженного иглой.

В качестве примера в соответствии с вариантами осуществления, если вид представляет собой злаковое и если подпул, суперпул или вторичный подпул содержит зерна злаковых, указанный образец предпочтительно содержит часть зерна злаковых, которая не является необходимой для репродукции. Образец можно получить различными способами, например, путем отрезания части(ей) с помощью любого острого инструмента, такого как нож, скальпель или ножницы, измельчения части зерна, или его можно получить путем просверливания отверстия в зерне. В последнем случае образец может представлять собой муку, полученную после просверливания.

После получения образца организмов или образца, полученного от организмов или его частей (в настоящем документе также совместно называемых "образцом"), из указанных образцов можно получить образец гДНК любым пригодным способом. Если указанные образцы содержат большие структуры, например целые семена, первая стадия получения образца гДНК обычно будет предусматривать разделение указанного содержимого указанного образца на более мелкие части, например, физическими средствами, например дроблением или измельчением. Способы получения образца гДНК обычно предусматривают стадии разрушения клеток и/или тканей, например, детергентом, ферментами (например, литиказой), ультразвуком или их комбинациями, тем самым создавая сырой лизат. Указанный лизат можно отделить от любого оставшегося дебриса любыми пригодными способами. Сырой лизат может составлять образец гДНК. Альтернативно, гДНК можно дополнительно очистить, например, путем отделения указанной гДНК от остальной части лизата, например, путем связывания с селективной матрицей, центрифугирования, градиентного центрифугирования и/или осаждения (например, с применением осаждающего средства, такого как соль, спирт или магнитные микроносители). Перед таким разделением другие компоненты лизата, включая белки и/или нуклеопротеины, можно подвергнуть денатурации или разрушить, например, с помощью ферментов и/или денатурирующих средств. Другие РНК-содержащие молекулы можно удалить, например, с помощью ферментов. Пригодные способы получения образцов гДНК описаны, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning - Laboratory Manual*, ISBN 978-1-936113-42-2.

ПЦР-амплификация, включающая множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций.

Способы по настоящему изобретению предусматривают стадию проведения множества ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает образец гДНК из одного подпула (например, полученного так, как описано в разделах выше), тем самым амплифицируя целевую последовательность. Каждая

ПЦР-амплификация может включать множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций, каждая из которых содержит часть указанного образца гДНК, один или несколько наборов праймеров, фланкирующих целевую последовательность, и реагенты для ПЦР.

Всю ПЦР-реакцию, включающую множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций, можно провести рядом способов. В соответствии с одним вариантом осуществления, ПЦР-амплификацию, включающую множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций, можно проводить как цифровую ПЦР-амплификацию (dPCR). С настоящим изобретением можно применять любую dPCR-амплификацию, известную специалисту в настоящей области техники. Как правило, для каждого полученного образца гДНК будут проводить по меньшей мере одну dPCR-амплификацию, включающую множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций. Таким образом, для каждого подпула будут проводить по меньшей мере одну dPCR-амплификацию, включающую множество компартиментализированных dPCR-амплификаций.

Как правило, компартиментализированную dPCR-амплификацию проводят согласно способу, предусматривающему стадии

получения смеси для dPCR-амплификации, содержащей образец гДНК, набор праймеров, фланкирующих целевую последовательность, и реагенты для ПЦР;

разделения на части указанной смеси для dPCR-амплификации так, чтобы молекулы нуклеиновой кислоты в образце были локализованы и сконцентрированы во множестве пространственно разделенных компартиментов;

проведения dPCR-амплификации;

детектирования продуктов dPCR-амплификации.

Указанные разделенные компартименты могут быть любыми отдельными компартаментами, в которых можно проводить ПЦР-амплификации. Например, это может быть лунка планшета, например лунка микролуночного планшета или микротитровального планшета, это могут быть микрожидкостные камеры, это могут быть капилляры, это может быть дисперсная фаза эмульсии, или это может быть капля, или это могут быть минитюаризированные камеры из матрицы миниатюризированных камер. Разделенные компартименты также могут быть дискретными пятнами на твердой подложке, например дискретными поверхностями, связывающими нуклеиновую кислоту.

Как правило, предпочтительно, чтобы образец гДНК распределялся случайным образом на образцы для компартиментализированной dPCR-амплификации. Также предпочтительно, чтобы каждая компартиментализированная dPCR-амплификация включала лишь небольшое количество нуклеиновых кислот, содержащих целевую последовательность. Из-за природы случайного распределения могут быть некоторые варьирования в количестве молекул нуклеиновой кислоты, включенных в каждую компартиментализированную dPCR-амплификацию. В соответствии с одним вариантом осуществления каждая компартиментализированная dPCR-амплификация включает в среднем не более 10, к примеру не более 5, молекул нуклеиновой кислоты, содержащих целевую последовательность.

В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения dPCR-амплификация, включающая множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций, представляет собой капельную цифровую полимеразную цепную реакцию (ddPCR). ddPCR является способом проведения dPCR, в основе которого лежит технология капель эмульсии по типу масло в воде. ПЦР-амплификацию делят на множество микрокапель, и в каждой отдельной капле происходит ПЦР-амплификация целевой последовательности. В целом методика ddPCR предусматривает применения реагентов для ПЦР и последовательностей действий, аналогичных тем, которые применяют для проведения традиционных ПЦР. Таким образом, разделение на части ПЦР-амплификации является ключевым аспектом методики ddPCR.

Следовательно, компартиментализированные ddPCR-амплификации могут содержаться в каплях, которые могут, например, включать эмульсионные композиции или смеси из двух или более несмешивающихся жидкостей (например, как описано в патенте США № 7622280 или как описано в приведенных ниже примерах). Капли можно создать при помощи устройств, описанных в WO/2010/036352. В частности, капли можно получить с помощью устройства для создания капель, например устройства для создания капель QX200 Droplet Generator, доступного от Bio-Rad Laboratories, США (далее сокращенно Bio-Rad). Применяемый в контексте настоящего описания термин эмульсия может обозначать смесь несмешивающихся жидкостей (таких как масло и вода). Эмульсии могут представлять собой, например, капли воды в масле, например, как описано в [Hindson, BJ et al. (2011), High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number, Anal. Chem., 83: 8604-8610]. Эмульсии могут, таким образом, содержать водные капли в непрерывной масляной фазе. Эмульсии также могут быть эмульсиями по типу масло в воде, где капли представляют собой капли масла в непрерывной водной фазе. В контексте настоящего описания капли обычно предназначены для предупреждения смешивания между компартаментами, при этом содержимое отдельного компартамента не только защищено от испарения, но также защищено от слияния с содержимым других компартиментов. Таким образом, каждую каплю можно рассматривать как пространственно отделенный компартимент.

Каждая капля для ddPCR может иметь любой полезный объем. Предпочтительно тем не менее, что-

бы капли имели объем в нл диапазоне. Соответственно предпочтительно, чтобы объем капель в среднем находился в диапазоне от 0,1 до 10 нл.

Как известно, микрожидкостные способы получения эмульсионных капель с помощью микроканальной фокусировки с поперечными потоками или физического перемешивания позволяют получить либо монодисперсные, либо полидисперсные эмульсии. Капли могут быть монодисперсными каплями. Кроме того, капли можно создать так, чтобы их размеры не варьировали более чем на  $\pm 5\%$  от среднего размера капель. В некоторых случаях капли создают так, чтобы размеры капель варьировали лишь на  $\pm 2\%$  от среднего размера капель.

Для микрожидкостных манипуляций и жидкостной обработки с большими сдвиговыми усилиями может быть полезна более высокая механическая стабильность (например, в микрожидкостных капиллярах или при поворотах на  $90^\circ$ , таких как клапаны в жидкостных каналах). В отношении стандартных манипуляций с пипеткой и центрифугирования могут быть механически стабильны подвергнутые термической пре-или постобработке капли или капсулы.

Каплю можно сформировать путем пропускания потока масляной фазы через водный образец. Водная фаза может содержать или состоять из компонентов смеси для ПЦР-амплификации, например смеси для ПЦР-амплификации, содержащей образец гДНК, набор праймеров, фланкирующих целевую последовательность, и реагенты для ПЦР, такие как любой из реагентов для ПЦР, описанных в настоящем документе ниже в разделе "Реагенты для ПЦР".

Масляная фаза может содержать фторированное базовое масло, которое можно дополнительно стабилизировать путем объединения со фторированным поверхностно-активным веществом, таким как простой перфторированный полиэфир. В некоторых случаях базовое масло может представлять собой одно или несколько из HFE 7500, FC-40, FC-43, FC-70 или другое общеизвестное фторированное масло. В некоторых случаях анионным поверхностно-активным веществом является Ammonium Krytox (Krytox-AM), аммониевая соль Krytox FSH или морфолинопроизводное Krytox-FSH.

Масляная фаза может дополнительно содержать добавку для регулировки свойств масла, таких как давление паров, вязкость или поверхностное натяжение. Неограничивающие примеры включают перфтороктанол и 1H,1H,2H,2H-перфтордеканол. Масляная фаза также может представлять собой масло для создания капель, например масло Droplet Generation Oil, доступное от Bio-Rad.

Эмульсия может быть составлена для получения высокомонодисперсных капель, имеющих жидкоподобную межфазную пленку, которую можно преобразовать путем нагревания в микрокапсулы, имеющие твердоподобную межфазную пленку; такие микрокапсулы могут вести себя как биореакторы, которые сохраняют свое содержимое в процессе реакции, такой как ПЦР-амплификация. Преобразование в форму микрокапсул может происходить при нагревании. Например, такое преобразование может происходить при температуре более 50, 60, 70, 80, 90 или  $95^\circ\text{C}$ . В некоторых случаях такой нагрев происходит с помощью термоциклера. Во время процесса нагревания для предотвращения испарения можно верхним слоем нанести жидкость или минеральное масло.

В некоторых случаях капли создают с помощью коммерчески доступного устройства для создания капель, такого как QX100™ Droplet Generator от QX200™ Droplet Generator от Bio-Rad. DdPCR и последующее детектирование можно выполнить с помощью коммерчески доступного капельного ридера, такого как Bio-Rad QX100 или QX200™ Droplet Reader.

Каждую ПЦР-амплификацию можно компартментализировать на любое подходящее количество компартментов. Тем не менее в соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления каждую ПЦР-амплификацию компартментализируют на компартменты в количестве, варьирующем в диапазоне от 1000 до 100000 компартментов (например, капель). Например, каждую ПЦР-амплификацию можно компартментализировать на компартменты в количестве, варьирующем в диапазоне от 10000 до 50000 компартментов (например, капель). Например, каждую ПЦР-амплификацию можно компартментализировать на компартменты в количестве, варьирующем в диапазоне от 15000 до 25000 компартментов (например, капель). Кроме того, каждую ПЦР-амплификацию можно компартментализировать на примерно 20000 компартментов (например, капель).

Реагенты для ПЦР.

Способ предусматривает проведение нескольких ПЦР-амплификаций, где по меньшей мере некоторые из этих ПЦР могут включать множество компартментализированных ПЦР-амплификаций.

Независимо от того, включает ли указанная ПЦР компартментализированные ПЦР-амплификации или нет, смесь для ПЦР-амплификаций, как правило, будет содержать образец гДНК, набор праймеров, фланкирующих целевую последовательность, и реагенты для ПЦР. Указанные реагенты для ПЦР могут быть любыми из описанных в данном разделе реагентов для ПЦР.

Реагенты для ПЦР обычно содержат по меньшей мере нуклеотиды и полимеразу нуклеиновой кислоты. Нуклеотиды могут представлять собой молекулы дезоксирибонуклеотидтрифосфата, и предпочтительно реагенты для ПЦР содержат по меньшей мере dATP, dCTP, dGTP и dTTP. В некоторых случаях реагенты для ПЦР также содержат dUTP.

Полимераза нуклеиновой кислоты может представлять собой любой фермент, способный катализи-



ровать матричную полимеризацию нуклеотидов, т.е. репликацию. Полимераза нуклеиновой кислоты должна переносить температуры, применяемые для ПЦР-амплификаций, и она должна обладать каталитической активностью при температуре элонгации. Специалистам в настоящей области известно несколько термостабильных полимераз нуклеиновых кислот.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения полимераз нуклеиновой кислоты обладает 5'-3' нуклеазной активностью, и, следовательно, ее можно применять в реакции амплификации с зондом TaqMan®.

Полимеразой нуклеиновых кислот может быть ДНК-полимераза I *Escherichia coli*. Полимеразой нуклеиновых кислот также может быть ДНК-полимераза Taq, которая обладает зависимой от синтеза ДНК, заменяющей цепь, 5'-3' экзонуклеазной активностью. К другим полимеразам, обладающим 5'-3' нуклеазной активностью, относится без ограничения ДНК-полимераза rTth. К ДНК-полимеразе Taq, например, полученной от New England Biolabs, можно отнести ДНК-полимеразу Crimon LongAmp® Taq, ДНК-полимеразу Crimson Taq, Hemo KlenTaq™ или LongAmp® Taq.

В некоторых случаях полимеразой нуклеиновой кислоты может быть, например, ДНК-полимераза *E. coli*, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, ДНК-полимераза T7, ДНК-полимераза T4, полимеразы Taq, ДНК-полимераза Pfu, ДНК-полимераза Vent, полимеразы бактериофага 29, REDTaq™, геномная ДНК-полимераза или секвенза. ДНК-полимеразы описаны, например, в публикации заявки на выдачу патента США № 20120258501.

Кроме того, реагенты для ПНР могут содержать соли, буферы и средства детекции. Буфером может быть любой пригодный буфер, например TRIS. Солю может быть любая пригодная соль, например хлорид калия, хлорид магния, или ацетат магния, или сульфат магния.

Реагенты для ПНР могут содержать неспецифическое блокирующее средство, такое как BSA, желатин из бычьей кожи, бета-лактоглобулин, казеин, сухое молоко, ДНК из молока лосося или другие общеизвестные блокирующие средства.

Реагенты для ПНР также могут содержать биоконсерванты (например, NaN<sub>3</sub>), усилители ПНР (например, бетаин, трегалозу и т.д.) и ингибиторы ПНР (например, ингибиторы РНКазы). Другие добавки могут включать диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, бетаина (моно)-гидрат, трегалозу, 7-дезаза-2'-дезоксигуанозинтрифосфат (7-дезаза-2'-dGTP), бычий сывороточный альбумин (BSA), формамид (метанамид), хлорид тетраметиламмония (TMAC), другие производные тетраалкиламмония [например, хлорид тетраэтиламмония (TEA-Cl)]; хлорид тетрапропиламмония (TPrA-Cl) или неионогенный детергент, например Triton X-100, Tween 20, Nonidet P-40 (NP-40) или PREXCEL-Q.

Кроме того, реагенты для ПНР также могут содержать одно или несколько средств для детекции продукта(ов) ПЦР-амплификации, содержащих мутацию(и) по одному или нескольким NOI. Указанными средствами могут быть любые средства для детекции, и их можно добавлять в виде отдельных соединений, или они могут быть связаны или даже ковалентно связаны с одним из праймеров. К средствам для детекции относятся без ограничения красители, радиоактивные соединения, биолюминесцентные и флуоресцентные соединения. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления средство для детекции представляет собой один или несколько зондов. Таким образом, предпочтительно, чтобы реагент для ПЦР содержал один или несколько зондов для детекции, например любой из зондов, описываемых в настоящем документе ниже в разделе "Детектирование продукта(ов) ПЦР-амплификации".

Праймеры, фланкирующие целевую последовательность.

Способы по настоящему изобретению предусматривают применение одного или нескольких наборов праймеров, которые фланкируют целевую последовательность. Дискретный "набор праймеров", который фланкирует целевую последовательность, включает один праймер, содержащий последовательность, идентичную 5'-концу целевой последовательности (который также называют "прямым праймером"), и один праймер, содержащий последовательность, комплементарную 3'-концу целевой последовательности (который также называют "обратным праймером"). С помощью набора праймеров можно амплифицировать целевую последовательность при добавлении в смесь для ПЦР вместе с нуклеиновой кислотой, содержащей целевую последовательность, и реагентами для ПЦР в условиях, позволяющих проходить амплификации указанной целевой последовательности. Для всех ПЦР-амплификаций способов по настоящему изобретению можно применять один и тот же набор праймеров, хотя также можно применять и разные наборы праймеров для ПЦР-амплификаций на различных стадиях по настоящему изобретению.

Помимо последовательности, идентичной 5'-концу целевой последовательности, прямой праймер может содержать дополнительные последовательности. Аналогично, помимо последовательности, комплементарной 3'-концу целевой последовательности, обратный праймер может содержать дополнительные последовательности. Например, праймеры могут на 5' -конце содержать дополнительную последовательность нуклеиновой кислоты, которая не гибридизуется с целевой нуклеиновой кислотой, но которая облегчает работу с праймером или продуктом ПЦР-амплификации, например детектирование указанного продукта.

Длина прямого праймера и обратного праймера может зависеть от последовательности целевой по-

следовательности. Например, длину праймеров можно скорректировать для достижения требуемой температуры плавления  $T_m$  праймеров. Таким образом, длина прямого праймера и обратного праймера может по отдельности варьировать в диапазоне от 10 до 100 нуклеотидов, например в диапазоне от 10 до 50 нуклеотидов, к примеру в диапазоне от 15 до 20 нуклеотидов, к примеру в диапазоне от 15 до 25 нуклеотидов, к примеру в диапазоне от 15 до 30 нуклеотидов, к примеру в диапазоне от 15 до 40 нуклеотидов, к примеру в диапазоне от 15 до 45 нуклеотидов, к примеру в диапазоне от 15 до 50 нуклеотидов, в длину.  $T_m$  прямого праймера и обратного праймера обычно корректируют до диапазона от 40 до 70°C.

Концентрация праймера в водной фазе ПЦР-амплификаций может быть, например, в диапазоне от 0,05 до 2,0 мкМ, к примеру в диапазоне от 0,1 до 1,0 мкМ, к примеру в диапазоне от 0,2 до 1,0 мкМ, к примеру в диапазоне от 0,3 до 1,0 мкМ, к примеру в диапазоне от 0,4 до 1,0 мкМ или в диапазоне от 0,5 до 1,0 мкМ.

Прямой праймер и обратный праймер обычно содержат олигонуклеотиды или даже состоят из них. Тем не менее в некоторых случаях праймеры могут содержать аналоги нуклеотидов. Специалистам в настоящей области известны многочисленные аналоги нуклеотидов, к которым относятся производные, в которых модифицирован сахар, например производные, содержащие 2'-О-метил, 2'-дезоксид-2'-фтор и 2',3'-дидезоксинуклеозидные производные, аналоги нуклеиновых кислот на основе других основных сахарных остовов, таких как треоза, запертые нуклеиновые кислоты (LNA), производные LNA, пептидные нуклеиновые кислоты (PNA), гликолевая нуклеиновая кислота (GNA), треозная нуклеиновая кислота (TNA), бициклические сахара или гексоза, глицерин и гликолевые сахара, аналоги нуклеиновых кислот на основе неионогенных остовов или нуклеиновые кислоты и их аналоги в нелинейных топологиях, такие как дендримеры, гребенчатые структуры и наноструктуры.

Праймеры также могут быть связаны с различными метками (например, флуоресцентными метками, функционализированными метками или связывающими метками), которые могут быть необязательно связаны с их концами, сахарами или нуклеиновыми основаниями.

Праймеры можно получить различными способами, включая без ограничения клонирование соответствующих последовательностей и прямой химический синтез с помощью способов, хорошо известных из уровня техники [Narang et al., *Methods Enzymol.*, 68:90 (1979); Brown et al., *Methods Enzymol.* 68:109 (1979)]. Праймеры также можно получить из коммерческих источников.

Прямой праймер и обратный праймер могут иметь одинаковую температуру плавления или сходную температуру плавления, например температуру плавления  $\pm 5^\circ\text{C}$ . Длина праймеров может быть увеличена или уменьшена на 5'- и/или 3'-концах для создания набора праймеров с требуемыми температурами плавления. Соответственно один из праймеров в паре праймеров может быть длиннее, чем другой праймер.

Праймеры могут быть спроектированы на основе температуры плавления. Уравнение для определения температуры плавления праймеров менее 25 п. о. известно как правило Уоллеса [ $T_d = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ ]. В настоящем контексте  $T_d$  представляет собой температуру при конкретной концентрации соли, при которой 50% олигонуклеотида и связанной по правилу идеального фильтра его комплементарной цепи находятся в конформации дуплекса. Как правило,  $T_d$  определяют в 0,9 М NaCl. Тем не менее при проектировании праймера также важны и другие аспекты, например прогнозируемая вторичная структура. Для проектирования праймеров доступны несколько компьютерных программ и онлайн-сервисов.

В соответствии с одним вариантом осуществления набор праймеров можно спроектировать таким образом, чтобы праймеры были способны специфически амплифицировать целевую последовательность, содержащую мутацию по NOI, но не были способны амплифицировать целевую последовательность, содержащую эталонный NOI. Это может быть достигнуто, например, путем проектирования прямого праймера так, чтобы он содержал последовательность, идентичную одному или нескольким NOI, содержащим мутацию(и), и/или это можно сделать путем проектирования обратного праймера так, чтобы он содержал одну или несколько последовательностей, комплементарных NOI, содержащему мутацию(и).

В соответствии с другими вариантами осуществления набор праймеров можно спроектировать таким образом, чтобы праймеры были способны специфически амплифицировать целевую последовательность, содержащую эталонный NOI, но не были способны амплифицировать целевую последовательность, содержащую мутацию(и) по NOI. Это может быть достигнуто, например, путем проектирования такого прямого праймера, чтобы он содержал последовательность, идентичную эталонному NOI, и/или путем проектирования обратного праймера, который содержит последовательность, комплементарную эталонному NOI.

Тем не менее в соответствии с предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения наборы праймеров способны амплифицировать как целевую последовательность, которая содержит мутацию(и) по одному или нескольким NOI, так и целевую последовательность, содержащую эталонный NOI.

Следует отметить, что способы по настоящему изобретению предусматривают ПЦР-амплификации с более чем одним набором праймеров, например с 2 наборами праймеров, к примеру с 3 наборами праймеров, например в диапазоне от 2 до 10 наборов праймеров.

Таким образом, каждая смесь для ПЦР-амплификации может содержать несколько наборов праймеров, фланкирующих различные целевые последовательности. Это позволяет детектировать несколько различных мутаций во время одной ПЦР-амплификации.

Детектирование продукта(ов) ПЦР.

Способы по настоящему изобретению предусматривают по меньшей мере две стадии детектирования продукта(ов) ПЦР-амплификации, содержащего(их) целевую последовательность(и), которая(ые) содержит(ат) мутацию(и) в представляющем интерес NOI. Продукт(ы) ПЦР-амплификации можно детектировать с помощью любых пригодных средств.

Как описано выше, указанная мутация(и) может(могут) представлять собой замену(ы), делецию(и) и/или вставку(и), включающую(ие) от только одного или нескольких нуклеотидов до большого количества нуклеотидов. Таким образом, детекцию можно адаптировать к конкретной мутации, задаваемой посредством NOI.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления набор праймеров проектируют таким образом, чтобы праймеры были способны специфически амплифицировать целевую последовательность, содержащую мутацию(и) по одному или нескольким NOI, но не были способны амплифицировать целевую последовательность, содержащую эталонный NOI. В соответствии с другими вариантами осуществления набор праймеров можно спроектировать таким образом, чтобы праймеры были способны специфически амплифицировать целевую последовательность, содержащую эталонный NOI, но не целевую последовательность, содержащую мутацию(и) по одному или нескольким NOI. В соответствии с такими вариантами осуществления детекция может быть просто основана на детектировании наличия или отсутствия продукта ПЦР-амплификации. Это может, в частности, иметь место в вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых мутация представляет собой мутацию большего количества NOI.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления продукты ПЦР-амплификации детектируют с помощью зонда(ов) для детекции. Это может, в частности, иметь место, если мутация(и) представляет собой мутацию меньшего количества NOI, например одну или несколько точечных мутаций.

Зонд для детекции может представлять собой олигонуклеотид, содержащий последовательность, идентичную NOI, содержащему мутацию. Кроме того, указанный зонд обычно также содержит последовательности, идентичные участкам целевой последовательности, которые фланкируют NOI. Аналогичным образом зонд для детекции может представлять собой олигонуклеотид, содержащий последовательность, которая комплементарна NOI, содержащему мутацию, и, кроме того, указанный зонд может также содержать последовательности, комплементарные участкам целевой последовательности, фланкирующим NOI. Указанные участки, фланкирующие NOI, могут представлять собой последовательность(и) непосредственно 5' и/или 3' от одного или нескольких NOI соответственно. Такие зонды предпочтительно будут гибридизироваться с продуктами ПЦР-амплификации, содержащими мутацию по NOI, но не с продуктами ПЦР-амплификации, содержащими эталонный NOI. Такие зонды для детекции в настоящем документе также называются "зондами для детекции мутантной последовательности". Зонд для детекции мутантной последовательности обычно содержит в диапазоне от 10 до 30 нуклеотидов. В частности, зонд для детекции мутантной последовательности может содержать непрерывную последовательность в диапазоне от 10 до 30 нуклеотидов, идентичную или комплементарную целевой последовательности, содержащей мутацию по NOI.

Зонд для детекции также может представлять собой олигонуклеотид, содержащий последовательность, которая идентична эталонному NOI. Кроме того, указанный зонд обычно также содержит последовательности, идентичные участкам целевой последовательности, фланкирующим NOI. Аналогичным образом зонд для детекции может представлять собой олигонуклеотид, содержащий последовательность, которая комплементарна эталонному NOI, и указанный зонд может дополнительно также содержать последовательности, комплементарные участкам целевой последовательности, фланкирующим NOI. Такие зонды предпочтительно будут гибридизироваться с продуктами ПЦР-амплификации, содержащими эталонный NOI, но не с теми продуктами амплификации, которые содержат мутацию по NOI. Такие зонды для детекции в настоящем документе также называют "зондами для детекции эталонной последовательности". Зонд для детекции эталонной последовательности обычно содержит в диапазоне от 10 до 30 нуклеотидов. В частности, зонд для детекции эталонной последовательности может содержать непрерывную последовательность в диапазоне от 10 до 30 нуклеотидов, идентичную или комплементарную целевой последовательности, содержащей эталонный NOI.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, реагенты для ПЦР содержат набор зондов, состоящий из зонда для детекции мутантной последовательности и зонда для детекции эталонной последовательности. "Набор зондов" предпочтительно способен конкурировать за сайт(ы) связывания в одном или нескольких NOI при добавлении в смесь для ПЦР-амплификации вместе с нуклеиновой кислотой, содержащей целевую последовательность, реагенты для ПЦР и набор праймеров, в условиях, позволяющих проходить амплификации указанной целевой последовательности. Как отмечено выше, зонды для детекции обычно представляют собой олигонуклеотиды. В частности, они могут быть короткими нуклеотидными фрагментами одноцепочечной ДНК. Зонды для детекции могут быть связаны или

даже ковалентно связаны с детектируемыми средствами, включая без ограничения репортеры, красители, радиоактивные соединения, биолуминесцентные соединения, флуоресцентные соединения и пары флуорофор/гаситель флуоресценции.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления наиболее 5' нуклеотидом зонда для детекции не является G. Таким образом, зонд для детекции мутации может содержать олигонуклеотид, где наиболее 5' нуклеотид не является G. Аналогично зонд для детекции эталонной последовательности может содержать олигонуклеотид, где наиболее 5' нуклеотид не является G.

Способы по настоящему изобретению могут предусматривать применение как зонда для детекции мутантной последовательности, так и зонда для детекции эталонной последовательности. В таких случаях предпочтительно, чтобы зонды были помечены дифференциально, например так, чтобы один из зондов был связан или ковалентно связан с детектируемыми средствами, а другой нет. Также возможно, чтобы оба зонда были связаны или ковалентно связаны с детектируемыми средствами, причем указанные детектируемые средства были различными.

В соответствии с одним вариантом осуществления, эталонный зонд для детекции помечен флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце. Указанные флуорофор и гаситель флуоресценции могут, например, представлять собой соответственно HEX и Black-Hole Quencher. В соответствии с одним вариантом осуществления зонд для детекции мутантной последовательности помечен флуорофором на 5'-конце и гасителем флуоресценции на 3'-конце. Указанные флуорофор и гаситель флуоресценции могут, например, представлять собой соответственно FAM и Black-Hole Quencher.

Реакционные смеси для ПЦР могут содержать одинаковое количество зонда для детекции мутантной последовательности и зонда для детекции дикого типа. Тем не менее в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, может быть предпочтительным использование избытка зонда для детекции мутантной последовательности. Это может, в частности, иметь место для детектирования продукта(ов) ПНР после ПЦР-амплификации в суперпуле. В таких случаях реакционные смеси для ПЦР могут содержать по меньшей мере 2-кратный, более предпочтительно по меньшей мере 4-кратный, избыток зонда для детекции мутантной последовательности по сравнению с зондом для детекции эталонной последовательности.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления зондом для детекции является зонд TaqMan® (Heid et. al, 1996), который использует преимущество 5'-экзонуклеазной активности полимеразы нуклеиновой кислоты. Вот почему реагенты для ПЦР предпочтительно содержат полимеразу нуклеиновой кислоты с 5'-экзонуклеазной активностью (например, полимеразу Taq). Как правило, зонд TaqMan® может представлять собой либо зонд для детекции мутантной последовательности, как описано выше, либо зонд для детекции эталонной последовательности, как описано выше, ковалентно связанный с парой флуорофор/гаситель флуоресценции. Таким образом, зонд может содержать флуорофор, обычно на 5'-основании или рядом с ним. Кроме того, зонды TaqMan® могут содержать гаситель флуоресценции, который может быть на 3'-основании или рядом с ним и который способен гасить флуоресценцию указанного флуорофора [ср. Tyagi et al., *Nature Biotechnology* 16:49-53 (1998)]. При облучении возбужденный флуорофор передает энергию ближайшему гасителю флуоресценции, а не флуоресцирует [Forster или резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET)]. Таким образом, близкое расположение флуорофора и гасителя флуоресценции может предотвратить испускание как-либо флуоресценции, пока зонд остается интактным. Однако, когда зонд TaqMan® гибридизируется с внутренним участком целевой последовательности, а полимеразы реплицирует матрицу, на которой присоединен зонд TaqMan®, ее 5'-экзонуклеазная активность может расщепить зонд. Эта серия событий устраняет функциональность гашения флуоресценции, т.е. отсутствие FRET, и флуорофор начинает испускать флуоресценцию, которую можно измерить любым пригодным способом.

Примечательно, что, как подчеркивалось выше, настоящим изобретением также охватывается то, что такие способы можно применять для выявления нескольких различных мутаций. Это может быть достигнуто путем применения множества наборов праймеров, как описано выше. Тем не менее это также может быть достигнуто путем применения нескольких различных зондов для детекции. Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления способы можно применять для выявления нескольких различных мутаций в пределах нескольких NOI в целевой последовательности. В соответствии с такими вариантами осуществления, реагенты для ПЦР могут содержать зонд для детекции эталонной последовательности и несколько зондов для детекции мутации, причем каждый зонд для детекции мутации содержит олигонуклеотид, имеющий последовательность, идентичную или комплементарную одной из мутаций. Предпочтительно зонд для детекции эталонной последовательности и зонд для детекции мутации связаны с различными средствами детекции. Все зонды для детекции мутаций могут быть связаны с одним и тем же средством детекции или со схожими средствами детекции или с различными средствами детекции.

В некоторых случаях зонд для детекции представляет собой молекулярный маяк (MB), т.е. зонд, содержащий комплементарные последовательности, способные к самогибридизации (также называемые "стеблем"), что приводит к образованию структуры "петля шпильки". Петля MB может содержать после-

довательности, комплементарные или идентичные одному или нескольким NOI либо мутантным, либо эталонным NOI. Кроме того, МВ обычно содержит флуорофор и гаситель флуоресценции, расположенные на любом конце МВ так, чтобы они были проксимальны друг к другу, когда зонд гибридизируется сам с собой. МВ может быть либо зондом для детекции мутантной последовательности, как описано выше, либо зондом для детекции эталонной последовательности, как описано выше, ковалентно связанным с парой флуорофор/гаситель флуоресценции и с последовательностью(ями) стебля, создавая комплементарные участки МВ. Дополнительные подробности, касающиеся стандартных способов получения и применения МВ, хорошо известны из литературы, а МВ доступны из ряда коммерческих поставщиков реагентов.

В некоторых случаях применяют праймер/зонд; в некоторых случаях праймер/зонд представляет собой зонд Scorpions™, который может обеспечивать стебле-петлевой механизм детекции на основе FRET, аналогичный МВ, за исключением того что зонд также имеет присоединенный сегмент, который выступает в роли прямого или обратного праймера (ср. Whitcombe et al., *Nature Biotechnol.*, 1999, August 17(8): 804-7; патент США № 6326145). Зонд Scorpions™ может поддерживать стебле-петлевую конфигурацию в негибридизованном состоянии, причем с погашенным флуорофором. Зонд Scorpions™ может иметь более длинную многокомпонентную структуру, например 5'-флуорофор, затем мишень-специфический стебле-петлевой участок, затем гаситель флуоресценции, затем блокатор [например, гексэтиленгликоль (HEG)] и, наконец, 3'-праймерную последовательность. Блокатор может предотвращать обратное удлинение цепи продукта на зонд.

В некоторых случаях праймер/зонд представляет собой зонд Sunrise™, который содержит праймер, присоединенный к шпильковому зонду, цепь которого удлиняется во время амплификации. Такое расположение может отделить внутренний гаситель флуоресценции от 5'-концевого флуорофора (Nazarenko et al., *Nucl. Acids Res.*, 1997, 25: 2516-2521).

Зонд для детекции может иметь любую пригодную длину, например, быть в диапазоне от 10 до 60 нуклеотидов в длину. Длина олигонуклеотидного зонда также может составлять в диапазоне от 10 до 30 нуклеотидов. Точная последовательность и длина олигонуклеотидного зонда могут частично зависеть от природы целевого полинуклеотида, с которым он связывается. Местоположение и длина связывания можно варьировать для достижения соответствующих свойств отжига и плавления для конкретной ситуации. Например, зонд для детекции можно спроектировать так, чтобы он имел температуру плавления в том же диапазоне, что и прямой праймер и/или обратный праймер, например в пределах  $\pm 10^\circ\text{C}$ , к примеру в пределах  $\pm 5^\circ\text{C}$ .

3'-концевой нуклеотид зонда(ов) для детекции можно заблокировать или сделать неспособным к удлинению цепи полимеразой нуклеиновых кислот. Такое блокирование можно с легкостью осуществить путем присоединения детектируемых средств либо посредством флуорофора, либо посредством гасителя флуоресценции к концевому 3'-основанию олигонуклеотидного зонда с помощью связывающего фрагмента.

В литературе имеется множество практических руководств, описывающих пригодные пары флуорофор-гаситель флуоресценции, в том числе способы выбора пар флуорофор-гаситель флуоресценции, которые в настоящем документе проиллюстрированы далее.

Clegg, *Meth. Enzymol.*, 211: 353-388 (1992); Wo et al., *Anal. Biochem.*, 218: 1-13 (1994); Pesce et al., editors, *Fluorescence Spectroscopy* (Marcel Dekker, New York, 1971); White et al., *Fluorescence Analysis: A Practical Approach* (Marcel Dekker, New York, 1970); и т.п.

Литература также включает материалы, содержащие исчерпывающие перечни флуоресцентных и хромогенных молекул и их соответствующие оптические свойства для выбора пар репортер-гаситель флуоресценции, например Berlmann, *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, 2nd Edition (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, *Colour and Constitution of Organic Molecules* (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, *Indicators* (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (Molecular Probes, Eugene, 1992) Pringsheim, *Fluorescence and Phosphorescence* (Interscience Publishers, New York, 1949); и т.п.

Кроме того, в литературе существует обширное руководство по дериватизации репортерных молекул и молекул гасителя флуоресценции для ковалентного присоединения через общие реакционноспособные группы, которые можно ввести в олигонуклеотид, что проиллюстрировано в следующих источниках литературы: Haugland (упомянут выше); Ullman и соавт., патент США № 3996345; Khanna и соавт., патент США № 4351760; и т.п.

Флуорофоры и гасители флуоресценции можно выбрать, например, из флуоресцеиновых и родаминовых красителей. Эти красители в сочетании с подходящими методиками связывания для присоединения к олигонуклеотидам описаны во многих источниках литературы, например Khanna и соавт. (упомянут выше); Marshall, *Histochemical J.*, 7:299-303 (1975); Menchen и соавт., патент США № 5188934; Menchen и соавт., европейская патентная заявка № 87310256.0; и Bergot и соавт., международная заявка PCT/US90/05565. Последние четыре документа настоящим включены в настоящее описание посредством ссылки.

В паре флуорофор/гаситель флуоресценции можно использовать такой флуорофор, как EDANS или флуоресцеин, например, на 5'-конце и такой гаситель флуоресценции, как Dabcyl, например, на 3'-конце.

Детекция продукта(ов) ПЦР-амплификации может предусматривать стадию сравнения сигнала, полученного при ПЦР-амплификации, включающей заданный образец гДНК, с сигналом, полученным при контрольной ПЦР-амплификации. Сигнал обычно может относиться к детектируемым средствам, связанным с зондом для детекции мутантной последовательности и/или с зондом для детекции последовательности дикого типа. Таким образом, если указанные зонды связаны с флуорофором, сигнал может представлять собой флуоресценцию. Контрольная ПЦР-амплификация может представлять собой ПЦР-амплификацию, проводимую в тех же условиях, но без образца гДНК, т.е. в указанной контрольной ПЦР-амплификации может отсутствовать матрица гДНК или она может содержать только контрольную ДНК, содержащую эталонную целевую последовательность, например гДНК дикого типа. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любой сигнал, который сильнее сигнала от контрольной ПЦР-амплификации, можно считать положительным сигналом, т.е. сигналом, указывающим на наличие целевой последовательности, содержащей одну или несколько мутаций по NOI.

В соответствии с одним вариантом осуществления положительным сигналом можно считать любой сигнал, который находится выше заданного порогового значения. Порог можно определить с помощью любого пригодного средства, обычно с помощью подходящего программного обеспечения, например капельного ридера QX200™ Droplet Reader и программного обеспечения Quantasoft™ Software, которые доступны от Biorad.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, в которых используют зонды для детекции эталонной последовательности, можно определить относительное содержание между сигналом, полученным от зонда для детекции мутации, и сигналом от зонда для детекции эталонной последовательности и применять его для оценки наличия продукта ПЦР. Относительное содержание можно определить следующим образом: [Сигнал от ("зонда для детекции мутантной последовательности")], деленный на [сигналы от ("зонда для детекции эталонной последовательности" + "зонда для детекции мутантной последовательности")].

Например, можно предположить, что образец содержит целевую ДНК, содержащую мутацию по NOI, при условии, что он при сравнении с контрольной ПЦР-амплификацией характеризуется

- 1) увеличенным относительным содержанием, и/или
- 2) увеличенной концентрацией капель с мутантными последовательностями, и/или
- 3) увеличенным количеством мутантных событий в масштабе 50% или выше относительно среднего.

Капли с мутантными последовательностями могут быть каплями, дающими положительный сигнал от зонда для детекции мутантной последовательности. В настоящем документе "мутантное событие" равно количеству капель с мутантными последовательностями.

Разделение подпулов на вторичные подпулы.

После выявления подпула, содержащего организм или его репродуктивные части, несущий мутацию по NOI, способы по настоящему изобретению предусматривают стадию разделения указанного подпула на множество вторичных подпулов.

Как описано выше, для получения образца гДНК можно было использовать часть подпула. Следовательно, для разделения на вторичные подпулы доступна только оставшаяся часть подпула. В рамках настоящего изобретения также предусмотрено, что подпул делят на несколько фракций и что для получения вторичного подпула используют лишь одну фракцию.

Каждый вторичный подпул может содержать только один организм или его репродуктивную часть(и). Альтернативно каждый вторичный подпул может содержать множество организмов или их репродуктивных частей. Например, каждый вторичный подпул может содержать множество организмов или их репродуктивных частей, представляющих множество генотипов.

Обычно подпул или его фракцию делят на множество вторичных подпулов, предпочтительно по меньшей мере на 5 вторичных подпулов, более предпочтительно по меньшей мере на 10 вторичных подпулов, еще более предпочтительно по меньшей мере на 30 вторичных подпулов, еще более предпочтительно по меньшей мере на 50 вторичных подпулов, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70 вторичных подпулов, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90 вторичных подпулов. В принципе не существует верхнего предела для количества вторичных подпулов. Однако, как правило, подпул делят не более чем на 50000, например не более чем на 25000, например не более чем на вторичных 10000 подпулов.

Каждый вторичный подпул может содержать один или множество организмов или их репродуктивных частей, представляющих множество генотипов. Предпочтительно каждый вторичный подпул содержит в диапазоне от 1 до 100, предпочтительно в диапазоне от 1 до 50, еще более предпочтительно в диапазоне от 1 до 20 организмов или их репродуктивных частей с различными генотипами.

Вторичные подпулы можно упорядочить любым необходимым способом. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вторичный подпул содержит только ограниченное количество организмов или их репродуктивных частей.

В соответствии с другими вариантами осуществления вторичный подпул содержит множество ор-

организмов одного и того же генотипа. Это можно обеспечить, если подвергнуть вторичный подпул стадии репродукции. Также возможно, чтобы стадию воспроизведения выполняли одновременно со стадией разделения подпула на вторичные подпулы таким образом, чтобы обеспечить попадание потомства одного организма или его репродуктивной части в один и тот же вторичный подпул.

Способы по настоящему изобретению предусматривают получение одного или нескольких образцов гДНК из вторичного подпула. В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если вторичный подпул содержит только один или несколько организмов каждого генотипа или их репродуктивных частей, тогда образец гДНК обычно получают из образца каждого организма или его репродуктивной части, например, как описано в настоящем документе выше в разделе "Получение образцов ДНК".

В соответствии с вариантами осуществления если вторичный подпул содержит множество организмов с отдельными генотипами или их репродуктивных частей с каждым генотипом, тогда образец гДНК можно получить из фракции вторичного подпула.

Пример способа разделения подпула на вторичные подпулы представлен на фиг. 1С, где первые стадии указанной фигуры иллюстрируют разделение подпула и получение образца гДНК.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения если вид представляет собой одноклеточный организм, то вторичные подпулы можно получить, например, следующим образом:

после выявления подпула, содержащего мутацию по NOI, каждому одноклеточному организму из указанного подпула можно позволить отдельно размножиться, так чтобы каждый одноклеточный организм давал клональную культуру (Это можно осуществить путем культивирования колоний каждого клона на твердой среде или путем культивирования каждого клона в отдельных пространствах с жидкой средой, например в микропробирках или в лунках микротитровальных планшетов. Вторичный подпул можно сформировать путем объединения одноклеточных организмов из множества клонов.);

одноклеточные организмы можно разделить на вторичные подпулы сразу после выявления представляющего интерес подпула, и каждому вторичному подпулу можно позволить репродуцироваться.

В соответствии с одним вариантом осуществления вторичные подпулы получают посредством следующих стадий:

- i) получения подпула, содержащего мутацию(и) в одном или нескольких NOI;
- ii) клональное размножение нескольких или всех организмов из указанного подпула с получением клональных культур;
- iii) объединение фракции организмов из множества указанных клональных культур с получением вторичных подпулов.

Как описано выше, образцы гДНК можно получить из части организма подпула, тогда как остальные организмы подпула можно оставить на хранение. Если организмы являются одноклеточными, то указанные организмы для хранения можно заморозить. В соответствии с такими вариантами осуществления, упомянутая выше стадия i) может включать стадию восстановления организмов путем инкубации в культуральной среде при температуре, подходящей для роста указанного организма. Предпочтительно указанная стадия восстановления включает лишь минимальное репродуцирование.

Упомянутую выше стадию ii) можно выполнить, например, путем посева организмов на твердую среду при достаточно низком титре, чтобы пространственно разделить организмы друг от друга на указанной среде.

Упомянутая выше стадия iii) может предусматривать объединение фракции в диапазоне от 10 до 1000, предпочтительно в диапазоне от 10 до 500, более предпочтительно в диапазоне от 10 до 100, например в диапазоне от 30 до 70 отдельных клональных культур. Может быть предпочтительным получить две копии каждого вторичного подпула. Это можно сделать путем объединения указанных фракций, как упомянуто выше, с последующим разделением каждого вторичного подпула по меньшей мере на 2 части. Альтернативно две копии каждого вторичного подпула можно получить с самого начала путем объединения фракций одних и тех же клональных культур в двух разных емкостях. Как правило, одну часть подпулов применяют для получения образца гДНК, тогда как другую оставляют на хранение (например, в замороженном виде в присутствии криопротектора). Перед получением образца гДНК и/или перед хранением вторичные подпулы можно подвергнуть стадии репродукции, например инкубации в среде для культивирования при температуре, пригодной для роста организма.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если вид представляет собой растение, вторичный подпул можно получить путем получения выборки каждого семени в подпуле и объединения выборок из заранее определенного количества семян. В соответствии с такими вариантами осуществления важно упорядочить вторичные подпулы таким образом, чтобы можно было выявить семена одного вторичного подпула и выборки указанного вторичного подпула. Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения, способы предусматривают стадии

получения подпула, содержащего множество семян растения, например зерен злаковых, причем указанный подпул содержит мутацию NOI;

разделения семян указанного подпула на вторичные подпулы, каждый из которых содержит по меньшей мере одно семя, например, в диапазоне от 1 до 100 семян;

получения образца от каждого семени из вторичных подпулов способом, который оставляет их достаточно интактными для развития в растение, и объединение всех образцов от всех семян из каждого вторичного подпула;

получения образца гДНК из указанных объединенных образцов.

Описанные выше стадии проиллюстрированы в верхней части фиг. 2D с применением зерен злаковых в качестве примера. Таким образом, способ может предусматривать стадии, проиллюстрированные на фиг. 2D. Также стадии, проиллюстрированные на фиг. 2D, можно выполнять с применением любого цветкового растения, соответственно не ограничиваясь злаковыми. Дополнительно стадии, проиллюстрированные на фиг. 2D, можно выполнять с применением любого количества мутантных растений (числа, представленные на фиг. 2D, являются лишь одним примером). Один пример способа разделения подпула на вторичные подпулы описан в настоящем документе ниже в WS4.

Выявление вторичных подпулов.

Способы по настоящему изобретению предусматривают стадии разделения подпула организмов или их репродуктивных частей, содержащих одну или несколько мутаций по одному или нескольким NOI, на вторичные подпулы с последующей стадией выявления вторичного подпула, содержащего организм или его репродуктивные части, содержащие мутацию(и), определяемую(ые) одним или несколькими NOI.

Выявление указанного вторичного подпула может предусматривать стадии

a) получения образцов гДНК, каждый из которых содержит гДНК от каждого генотипа в пределах одного вторичного подпула, что, например, можно выполнить так, как описано в настоящем документе выше в разделе "Получение образцов ДНК";

b) проведения множества ПЦР-амплификаций для амплификации целевой последовательности;

c) детектирования продукта(ов) ПЦР-амплификации, содержащего(их) мутацию(и) по одному или нескольким NOI, тем самым выявляя указанный(ые) вторичный(ые) подпул(ы), что, например, можно выполнить так, как описано в настоящем документе ниже в разделе "Детектирование продукта(ов) ПЦР-амплификации".

Описанная выше ПЦР-амплификация может представлять собой любую ПЦР-амплификацию целевой последовательности. Таким образом, указанная ПЦР-амплификация может представлять собой традиционную ПЦР-амплификацию или может представлять собой ПЦР-амплификацию, включающую множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций, как описано в настоящем документе выше.

Каждая из смесей для указанных ПЦР-амплификаций обычно включает образец гДНК из одного вторичного подпула, набор(ы) праймеров, фланкирующий(ие) целевую последовательность, и реагенты для ПЦР. Праймерами могут быть любые праймеры, описанные в настоящем документе выше в разделе "Праймеры, фланкирующие целевую последовательность". Реагенты для ПЦР могут быть любыми реагентами для ПЦР, описанными в настоящем документе в разделе "Реагенты для ПЦР". В частности, реагенты для ПЦР включают нуклеотиды и полимеразу нуклеиновой кислоты. Предпочтительно реагенты для ПЦР также содержат один или несколько зондов для детекции, например зонд для детекции мутации и/или зонд для детекции эталонной последовательности, которые описаны в настоящем документе выше в разделе "Детектирование продукта(ов) ПЦР".

Вторичный подпул можно непосредственно выявить, например, при условии, что продукт(ы) ПЦР-амплификации содержит(ат) мутацию(и) по NOI, которую(ые) можно непосредственно детектировать после или во время процесса ПЦР-амплификации. Это можно выполнить, например, если смесь для ПЦР-амплификации содержит средства детекции, которые дают детектируемый сигнал, при условии, что продукт(ы) ПЦР-амплификации содержит(ат) целевую последовательность, содержащую мутацию(и) в одном или нескольких NOI. Такие средства детекции более подробно описаны выше в разделе "Детектирование продукта(ов) ПЦР-амплификации" и могут, например, включать зонды для детекции мутации.

Один пример способа выявления вторичного подпула, содержащего указанную мутацию(и), проиллюстрирован в нижней части фиг. 1C, где показаны следующие стадии:

получение вторичного подпула;

получение выборки из части указанного вторичного подпула;

получение образца гДНК из указанного образца;

проведение ПЦР-амплификаций со всеми отдельными образцами гДНК от всех вторичных подпулов, например в отдельных лунках планшета, например в микротитровальных планшетах;

детектирование наличия целевой последовательности, содержащей мутацию по одному или нескольким NOI.

Более конкретный пример способа выявления вторичного подпула показан на фиг. 2D. В этом примере рассматриваемый вид представляет собой злаковое растение. Конкретные числа, приведенные на фиг. 2D, являются только примерами, и специалист в настоящей области техники поймет, что способ можно выполнить с применением другого количества зерен.

Следует отметить, что выявление вторичного подпула, содержащего NOI-специфическую мутацию(и), можно выполнить так, как описано в настоящем документе ниже в WS4.



Выявление организма.

После выявления вторичного подпула, содержащего организм или его репродуктивную часть, способ предусматривает выявление организма, содержащего мутацию(и) одного или нескольких NOI.

Это может быть осуществлено несколькими способами в зависимости от вида и от вторичных подпулов.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если вторичный подпул содержит только один организм или его репродуктивные части, организм или его репродуктивная(ые) часть(и) будут выявлены сразу после выявления соответствующего вторичного подпула.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если вторичный подпул содержит более одного организма или его репродуктивной(ых) части(ей), способы обычно предусматривают стадию выявления организма(ов). До этого одновременно или после выявления организмов или их репродуктивных частей вторичный подпул, содержащий мутацию(и) одного или нескольких NOI, можно подвергнуть стадии репродукции.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если вид представляет собой одноклеточный организм, указанная стадия репродукции может представлять собой клональное размножение организмов, например, путем клонирования каждого из организмов вторичного подпула пространственно разделенным образом. Таким образом, способ может предусматривать стадии

- i) получения вторичного подпула, содержащего мутацию по NOI;
- ii) клонального репродукции нескольких или всех организмов из указанного подпула;
- iii) определения, какие клоны включают организмы, содержащие мутацию по NOI.

Упомянутую выше стадию ii) можно выполнить, например, путем посева организмов на твердую среду при достаточно низком титре, чтобы пространственно разделить все организмы на указанной твердой среде.

Упомянутая выше стадия iii) может предусматривать получение образца гДНК из фракции каждого клона и проведение ПЦР-амплификации, например ПЦР-амплификации, фактически так, как описано в настоящем документе выше в разделе "Выявление вторичного подпула".

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если вид представляет собой растение, а вторичный подпул содержит семена указанного растения, способы могут предусматривать стадии

A) выявления вторичного подпула, включающего организм или его репродуктивные части, содержащего мутацию(и) по одному или нескольким NOI;

B) культивирования всех семян в указанном вторичном пуле для обеспечения возможности прорастания и необязательно роста растений из каждого семени;

C) получения образца от каждого проросшего семени;

D) тестирования указанного образца на наличие указанной(ых) мутации(й) по одному или нескольким NOI, причем указанное тестирование можно выполнять любым способом, например, путем получения образца гДНК из указанного образца и проведения ПЦР-амплификации так, как описано в настоящем документе выше, таким образом выявляя одно растение, несущее мутацию(и) по одному или нескольким NOI.

На упомянутой выше стадии B) указанные семена можно, например, прорастить и позволить им развиваться в проростки, содержащие корни, стебли и листья. В соответствии с такими вариантами осуществления образец, полученный на стадии C), может, например, представлять собой лист, корень или из части указанного проростка, такие как срезы первых листьев. После получения образца проросшее семя или проросток можно выращивать до зрелости. К настоящему изобретению также относится, что растения выращивают до зрелости, и в этом случае образец, полученный, например, на стадии C), может представлять собой лист, цветок, корень, семя, стебель или их части.

После выявления отдельного организма или его репродуктивных частей, содержащих одну или несколько мутаций по одному или нескольким NOI, указанный организм или его репродуктивные части обычно будут подвергаться одному или нескольким стадиям репродукции для получения множества организмов, содержащих такую мутацию.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, если выявленный организм является гетерозиготным по отношению к рассматриваемой мутации, способ может затем предусматривать стадии селекции указанного организма до гомозиготности по отношению к указанной мутации.

После выявления организма, содержащего мутацию(и) по одному или нескольким NOI, способы по настоящему изобретению могут предусматривать стадию дополнительной селекции указанного организма способом, сохраняющим мутацию(и) по одному или нескольким NOI. Такую селекцию можно проводить с целью объединения признака, придаваемого мутацией(ями) по одному или нескольким NOI, с признаками других организмов того же вида.

Способы также могут предусматривать дополнительные стадии проверки наличия мутации(й) по одному или нескольким NOI. Например, целевая последовательность или ген, содержащий целевую последовательность, можно полностью секвенировать.

Суперпулы.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения способы предусматривают стадию выявления группы подпулов, также называемых в настоящем документе суперпулами, содержащих мутацию(и) по одному или нескольким NOI. Таким образом, очень большое количество потенциальных организмов или их репродуктивных частей можно подвергнуть скринингу на наличие мутации(й) по одному или нескольким NOI. Указанную стадию предпочтительно выполняют после разделения пула на подпулы и получения образцов гДНК из подпулов, например, после стадии с) способов по настоящему изобретению.

Таким образом, способы могут предусматривать следующие стадии, выполняемые после стадии с):  
получение фракции каждого образца гДНК из каждого подпула;

объединение множества фракций подпулов в суперпулы с получением, таким образом, образцов гДНК суперпулов, содержащих гДНК множества подпулов;

проведение множества ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает образец гДНК из одного суперпула, причем каждая ПЦР-амплификация включает множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает часть указанного образца гДНК, набор(ы) праймеров, фланкирующий(е) целевую последовательность, и реагенты для ПЦР, тем самым амплифицируя целевую последовательность, причем указанную ПЦР, например, можно проводить так, как описано в настоящем документе ниже в разделе "ПЦР-амплификация на суперпуле";

детектирование продукта(ов) ПЦР-амплификаций, содержащего(их) целевую(ые) последовательность(и), содержащую(ие) мутацию(и) по одному или нескольким NOI, тем самым выявляя суперпул(ы), содержащий(е) указанную(ые) мутацию(и), причем указанную стадию детектирования, например, можно проводить так, как описано в настоящем документе выше в разделе "Детектирование продуктов ПЦР".

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления может быть предпочтительным обогащение образцов гДНК суперпулов. Это может помочь в специфическом детектировании целевой(ых) последовательности(ей), содержащей(их) мутацию(и) по одной или нескольким NOI. Стадия обогащения может предусматривать стадии

получения образцов гДНК из суперпулов, содержащих гДНК из множества подпулов, как описано выше;

проведения ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает образец гДНК суперпула, причем смесь для каждой ПЦР-амплификации включает набор праймеров, фланкирующих целевую последовательность, блокирующий зонд и реагенты для ПЦР.

ПЦР-амплификация, проводимая во время стадии обогащения, обычно представляет собой традиционную ПЦР-амплификацию и может, например, быть проведена так, как описано ниже в разделе "ПЦР". Зачастую эта ПЦР включает относительно небольшое количество циклов, например, в диапазоне от 10 до 30, например в диапазоне от 15 до 25 циклов ПЦР.

Блокирующий зонд обычно представляет собой зонд, предназначенный для ингибирования амплификации целевой последовательности, содержащей эталонный NOI. Таким образом, блокирующий зонд может, например, представлять собой олигонуклеотид, который

не может быть удлинен на 3'-конце ДНК-полимеразой;

предпочтительно связывает целевую последовательность, содержащую эталонный NOI, или комплементарную ей последовательность, а не целевую последовательность, содержащую заданную мутацию NOI.

Блокирующий зонд обычно содержит в диапазоне от 10 до 30 нуклеотидов. В частности, блокирующий зонд может содержать непрерывную последовательность в диапазоне от 10 до 30 нуклеотидов, идентичную или комплементарную целевой последовательности, содержащей эталонный NOI. Кроме того, блокирующий зонд обычно связан с блокирующим средством, которое ингибирует удлинение зонда ДНК-полимеразой.

Указанное блокирующее средство может, например, представлять собой фрагмент, ковалентно связанный с большинством 3'-нуклеотидов блокирующего зонда. Фактически большинство 3'-модификаций будут блокировать удлинение цепи. Например, указанное блокирующее средство можно выбрать из группы, состоящей из 2',3'-дидезокси-спейсера, 3'ddC и 3'-инвертированного dT. Блокирующее средство также может представлять собой модификацию концевой 3'-гидроксильной группы, например аминогруппой (например, 3'-амино) или алкилом, например 3' C3-спейсером. Блокирующим средством также может быть фосфорилирование 3'-нуклеотида.

После выявления суперпула, который содержит одну или несколько мутаций по одному или нескольким NOI, можно выполнить стадию d) и последующие стадии. Однако стадия d) может быть ограничена до проведения ПЦР-амплификации с образцами гДНК из подпулов, содержащихся в суперпуле.

Выявление суперпула также можно выполнить непосредственно после получения подпулов на стадии b). В таком случае способы могут предусматривать после стадии с) следующие стадии:

если подпулы содержат лишь несколько организмов, например только один организм или его репродуктивную часть каждого генотипа, указанные подпулы можно подвергнуть стадии репродукции;

получение фракции каждого подпула, которая представляет каждый генотип в подпуле, причем оставшаяся часть подпула также представляет каждый генотип в подпуле;

объединение множества фракций в суперпулы с получением таким образом суперпулов, содержащих организмы или их репродуктивные части из множества подпулов, причем организмы или их репродуктивные части присутствуют только в одном суперпуле;

получение образцов гДНК, каждый из которых содержит гДНК от каждого генотипа в пределах суперпула, что, например, можно выполнить так, как описано в настоящем документе выше в разделе "Получение образцов ДНК";

проведение множества ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает образец гДНК из одного суперпула, причем каждая ПЦР-амплификация включает множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает часть указанного образца гДНК, набор(ы) праймеров, фланкирующий(ие) целевую последовательность, и реагенты для ПЦР, тем самым амплифицируя целевую последовательность, причем указанную ПЦР, например, можно проводить так, как описано в настоящем документе ниже в разделе "ПЦР-амплификация на суперпуле";

детектирование продукта(ов) ПЦР-амплификаций, содержащего(их) целевую(ые) последовательность(и), содержащую(ие) мутацию(и) по NOI, с выявлением тем самым суперпула(ов), содержащего(их) указанную(ые) мутацию(и).

В соответствии с такими вариантами осуществления не имеет значения, чтобы образцы гДНК суперпулов были получены таким образом, чтобы сохранялся потенциал для репродуцирования организмов каждого генотипа в указанном суперпуле. Обычно этого достигают, потому что каждый суперпул содержит ДНК из ряда подпулов, а каждый подпул содержит организмы (или их репродуктивные части), представляющие каждый генотип в подпуле.

После выявления суперпула, содержащего мутацию(и) по одному или нескольким NOI, можно выполнить стадию с) и последующие стадии. Однако стадия с) может быть ограничена до получения образцов гДНК из подпулов, содержащихся в суперпуле.

Можно получить любое требуемое количество суперпулов, например, в диапазоне от 5 до 100, например в диапазоне от 5 до 50, например в диапазоне от 5 до 20.

Более конкретный пример способа выявления суперпула проиллюстрирован на фиг. 1D. Другой пример, в котором вид представляет собой злаковое, проиллюстрирован на фиг. 2E. Понятно, что числа, представленные на фиг. 2E, являются всего лишь примерами и что способ может быть выполнен с другим количеством зерен и т.д.

Неограничивающий пример получения и выявления суперпула также описан в настоящем документе ниже в WS5.

ПЦР-амплификация на суперпуле.

Способы по настоящему изобретению предусматривают стадию проведения множества ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает образец гДНК из одного суперпула, например, полученного так, как описано в приведенном выше разделе, причем каждая ПЦР-амплификация включает множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает часть указанного образца гДНК, набор праймеров, фланкирующих целевую последовательность, и реагенты для ПЦР, тем самым амплифицируя целевую последовательность.

В общем указанную ПЦР можно провести так, как описано в настоящем документе выше в разделе "ПЦР-амплификация, включающая множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций", однако предпочтительно с исключениями, которые описаны ниже.

Компартиментализированные ПЦР-амплификации могут быть заключены в каплях, как описано выше. Для ПЦР-амплификаций в суперпулах важна высокая чувствительность, тогда как для ПЦР-амплификаций на подпулах необходима более низкая чувствительность. В то время как для ПЦР-амплификаций с высокой чувствительностью обычно требуется большое количество реагентов, для ПЦР-амплификаций с более низкой чувствительностью необходимо меньшее количество реагентов. Таким образом, предпочтительно, чтобы ПЦР-амплификации на суперпулах имели чувствительность для детектирования одного или нескольких мутантных NOI в пределах по меньшей мере 200000, более предпочтительно в пределах по меньшей мере 250000 эталонных одного или нескольких NOI.

Для ПЦР-амплификаций на суперпуле может быть предпочтительным, чтобы каждая капля имела очень маленький объем, например объем в нл размере. Соответственно предпочтительно, чтобы капли в среднем имели объем в диапазоне от 0,1 до 10 нл.

Каждую ПЦР-амплификацию можно компартиментализировать на любое подходящее количество компартиментов. Тем не менее в соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления каждую ПЦР-амплификацию компартиментализируют на компартименты в количестве, варьирующем в диапазоне от 200000 до 100000000 компартиментов (например, капель). Например, каждую ПЦР-амплификацию можно компартиментализировать на компартименты в количестве, варьирующем в диапазоне от 500000 до 50000000 компартиментов (например, капель), например каждую ПЦР-амплификацию можно компартиментализировать на компартименты в количестве, варьирующем в диапазоне от 1000000 до 10000000 компартиментов (например, капель). Может быть предпочтительным, чтобы каждая ПЦР-

амплификация была компартиментализирована по меньшей мере на 1000000, предпочтительно по меньшей мере на 3000000, еще более предпочтительно по меньшей мере на 5000000, к примеру по меньшей мере на 7000000 компартиментов (например, капель).

В некоторых случаях капли создают с помощью коммерчески доступного устройства для создания капель, такого как RainDrop Digital PCR System от Raindance Technologies, система, которую также можно применять для детектирования продукта(ов) ПЦР-амплификации.

После получения компартиментализированных реакции ПЦР амплификацию можно проводить так, как описано ниже в разделе "ПЦР".

Детекцию наличия целевой последовательности, содержащей один или несколько мутантных NOI, можно выполнить так, как описано в настоящем документе выше в разделе "Детектирование продукта(ов) ПЦР".

В соответствии с одним вариантом осуществления может быть предпочтительным, чтобы детекцию выполняли с применением зонда для детекции эталонной последовательности и зонда для детекции мутантной последовательности, которые фактически описаны в разделе "Детектирование продукта(ов) ПЦР", причем используют избыток зонда для детекции мутантной последовательности. Предпочтительно, реакционные смеси для ПЦР содержат по меньшей мере 2-кратный, более предпочтительно по меньшей мере 4-кратный избыток зонда для детекции мутантной последовательности по сравнению с зондом для детекции эталонной последовательности. Также возможно, чтобы зонд для детекции эталонной последовательности не применяли, а применяли только зонд для детекции мутантной последовательности.

#### ПЦР.

Описываемые в настоящем документе способы предусматривают несколько стадий проведения ПЦР-амплификаций, в том числе компартиментализированных ПЦР-амплификаций, например ПЦР-амплификаций, которые описаны в разделе "ПЦР-амплификация, включающая множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций", или в разделе "ПЦР-амплификация на суперпуле".

В настоящем контексте, как правило, ПЦР-амплификация предусматривает стадии

1) получения смеси для ПЦР-амплификации, содержащей образец гДНК, набор праймеров, фланкирующих целевую последовательность, и реагенты для ПЦР;

2) проведения ПЦР-амплификации, которая обычно предусматривает стадии инкубации смеси для ПЦР-амплификации при температуре денатурации, например, в диапазоне от 85 до 100°C, например в диапазоне от 90 до 98°C в течение времени, достаточного для денатурирования двухцепочечной ДНК, например в диапазоне от 15 до 30 мин, к примеру в диапазоне от 30 с до 5 мин;

проведения множества циклов, например, в диапазоне от 10 до 60 циклов, к примеру в диапазоне от 20 до 40 циклов, включая следующие стадии:

инкубация при температуре отжига для обеспечения отжига между праймерами и целевой ДНК, например, в диапазоне от 15 с до 2 мин, к примеру в диапазоне от 30 с до 1 мин. Как правило, температура отжига будет схожей или ниже, чем температура плавления праймеров, например температура в диапазоне от 45 до 75°C. Инкубация при температуре отжига может также позволять проходить элонгации праймеров;

необязательно инкубация при температуре элонгации, при которой полимераза нуклеиновой кислоты обладает активностью, например при температуре в диапазоне от 55 до 75°C в течение периода времени от 15 с до 2 мин, например в диапазоне от 30 с до 1 мин;

инкубация при температуре денатурации, например при температуре в диапазоне от 85 до 100°C или в диапазоне от 90 до 98°C в диапазоне от 15 с до 2 мин, например в диапазоне от 30 с до 1 мин;

инкубация при температуре элонгации ДНК-полимеразой, например, в диапазоне от 55 до 98°C, к примеру в диапазоне от 15 с до 20 мин, к примеру в диапазоне от 1 до 15 мин.

Перед стадией амплификации, например перед стадией 2) из предыдущего перечня, ПЦР можно разделить на множество пространственно разделенных компартиментов для получения компартиментализированных ПЦР-амплификаций. Это можно осуществить, например, путем создания капель, например путем добавления масла для создания капель, и получения капель в устройстве для создания капель.

Растение ячменя, несущее мутацию в гене GS1-3.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к растению ячменя, несущему мутацию в гене, кодирующем глутаминсинтетазу 1, в частности изоформу 3 (GS1-3). Указанный ген также может называться геном HvGS1-3, кодирующая белок последовательность которого представлена в настоящем документе под SEQ ID NO: 1, тогда как аминокислотная последовательность кодируемых ферментов HvGS1-3 представлена под SEQ ID NO: 2.

Предпочтительно указанная мутация представляет собой мутацию, которая в указанном гене дает последовательность, которая кодирует мутантный фермент HvGS 1-3 с пониженной активностью. Активность HvGS1-3 является одной или несколькими из следующих:

- i) катализ конденсации аммония;
- ii) катализ конденсации аммиака и глутамата в глутамин;
- iii) катализ синтеза глутамилгидроксамата из глутамата, гидроксилamina и АТФ.

В частности, активность HvGS1-3 может быть такой, как описано в iii). В настоящем контексте активность, например, можно определить так, как описано в ниже примере 19 в разделе "In vitro анализ активности рекомбинантного HvGS 1-3".

Предпочтительно, чтобы мутантный белок HvGS1-3 обладал активностью, которая ниже активности белка дикого типа. Тем не менее фермент предпочтительно должен сохранять по меньшей мере некоторую активность. В частности, указанный мутантный белок HvGS1-3 может иметь  $k_{cat}$  ( $\text{мин}^{-1}$ ), которая находится в диапазоне от 1 до 20%, к примеру в диапазоне от 2 до 10% от  $k_{cat}$  ( $\text{мин}^{-1}$ ) белка HvGS1-3 дикого типа при определении так, как описано в условных обозначениях к примеру 19.

Полагают, что фермент HvGS1-3 дикого типа является декамером, состоящим из двух колец, состоящих из 5 субъединиц. В соответствии с одним вариантом осуществления мутантный белок HvGS1-3 содержит мутацию в аминокислотных остатках, находящихся на границе раздела между двумя кольцами. В частности, мутация может представлять собой мутацию в аминокислотном остатке, выбранном из группы, состоящей из аминокислотных остатков 141, 235, 285, 287 и 290 SEQ ID NO: 2.

Таким образом, растение ячменя может содержать мутацию в гене, кодирующем HvGS1-3, причем указанный ген кодирует мутантный белок HvGS1-3, несущий мутацию одного из вышеупомянутых аминокислотных остатков.

В частности, мутантный белок HvGS1-3 может представлять собой белок с мутацией в аминокислотном остатке № 287 из SEQ ID NO: 2, например с мутацией из Gly в любой другой аминокислотный остаток, такой как любой другой встречающийся в природе аминокислотный остаток. Мутация также может представлять собой мутацию аминокислотного остатка 287 из SEQ ID NO: 2, т.е. из Gly в полярный или заряженный аминокислотный остаток, например в аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Arg, Lys, Asp, Glu, Gln, Asn, His, Ser, Thr, Tyr, Cys, Met и Trp, или, например, в аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Arg, Lys, Asp, Glu, Tyr, Phe, Met и Trp. Мутация также может представлять собой мутацию аминокислотного остатка 287 из SEQ ID NO: 2 от Gly в заряженный остаток, например в аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Arg, Lys, Asp и Glu. В частности, мутация также может представлять собой мутацию аминокислотного остатка 287 из SEQ ID NO: 2 из Gly в Asp.

Таким образом, мутация в гене HvGS1-3 может представлять собой любую мутацию, приводящую в результате к получению гена HvGS1-3, кодирующего одну или несколько из вышеупомянутых мутаций. В соответствии с одним вариантом осуществления мутация гена может представлять собой мутацию одного или нескольких нуклеотидов 859, 860 и 861 с получением кодона, кодирующего один из вышеупомянутых аминокислотных остатков. В одном примере мутация представляет собой генную мутацию нуклеотида 860 из G в A.

В соответствии с одним вариантом осуществления мутантный белок HvGS1-3 может представлять собой белок, несущий мутацию в аминокислотном остатке № 235 из SEQ ID NO: 2, например мутацию из Asp в любой другой аминокислотный остаток. Мутация также может представлять собой мутацию аминокислотного остатка 235 из SEQ ID NO: 2 из Asp в положительно заряженный остаток, например в аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Arg и Lys. Таким образом, мутация в гене HvGS1-3 может представлять собой любую мутацию, приводящую в результате к получению гена HvGS1-3, кодирующего любой из вышеупомянутых мутантных белков HvGS1-3.

В соответствии с одним вариантом осуществления мутантный белок HvGS1-3 может представлять собой белок, несущий мутацию в аминокислотном остатке 285 из SEQ ID NO: 2, например мутацию из Gly в любую другую аминокислоту, такую как любая другая встречающаяся в природе аминокислота. Мутация также может представлять собой мутацию аминокислоты 285 из SEQ ID NO: 2 из Gly в полярную или заряженную аминокислоту, например в аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Arg, Lys, Asp, Glu, Gln, Asn, His, Ser, Thr, Tyr, Cys, Met и Trp. Таким образом, мутация в гене HvGS1-3 может представлять собой любую мутацию, приводящую в результате к получению гена HvGS1-3, кодирующего вышеупомянутые мутантные белки HvGS1-3.

В соответствии с одним вариантом осуществления мутантный белок HvGS1-3 может представлять собой белок, несущий мутацию в аминокислотном остатке 290 из SEQ ID NO: 2, например мутацию из Arg в любой другой аминокислотный остаток. Мутация также может представлять собой мутацию аминокислотного остатка 290 из SEQ ID NO: 2 из Arg в отрицательно заряженный аминокислотный остаток, например в аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Asp и Glu. Таким образом, мутация в гене HvGS1-3 может представлять собой любую мутацию, приводящую в результате к получению гена HvGS1-3, кодирующего вышеупомянутые мутантные белки HvGS1-3.

В соответствии с одним вариантом осуществления мутантный белок HvGS1-3 может представлять собой белок, несущий мутацию в аминокислотном остатке 141 из SEQ ID NO: 2, например мутацию из Trp в любой другой аминокислотный остаток. Мутация также может представлять собой мутацию аминокислотного остатка 141 из SEQ ID NO: 2 из Trp в любую другую встречающуюся в природе аминокислоту, кроме Tyr или Trp. Таким образом, мутация в гене HvGS1-3 может представлять собой любую мутацию, приводящую в результате к получению гена HvGS1-3, кодирующего любой из вышеупомянутых мутантных белков HvGS1-3.

Настоящая заявка также относится к приведенным далее вариантам осуществления.

1. Растение ячменя с мутацией в гене, кодирующем HvGS1-3, причем указанный мутантный ген кодирует мутантный белок HvGS1-3 с пониженной ферментативной активностью.

2. Растение ячменя по варианту осуществления 1, в котором мутантный белок HvGS1-3 имеет значение  $k_{cat}$  в отношении синтеза глутамилгидроксамата из глутамата, гидроксилamina и АТФ в диапазоне от 1 до 20% от  $k_{cat}$  HvGS1-3 дикого типа.

3. Растение ячменя по любому из вариантов осуществлений 1-2, у которого форма HvGS1-3 несет мутацию в аминокислотном остатке 287 из SEQ ID NO: 2.

4. Солод, приготовленный из растения ячменя по любому из вариантов осуществления 1-3.

5. Напиток, приготовленный из растения ячменя по любому из вариантов осуществления 1-3.

6. Способ получения напитка, причем указанный способ предусматривает стадии

i) получения зерен растения ячменя по любому из вариантов осуществления 1-3;

ii) необязательно осоложивания по меньшей мере части указанных зерен с получением, таким образом, солода;

iii) получения экстракта указанного ячменя и/или указанного ячменного солода;

iv) переработки указанного экстракта в напиток.

7. Способ по варианту осуществления 6, причем напиток представляет собой пиво.

Растение пшеницы, несущее мутацию в гене GASR7.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к растению пшеницы, несущему мутацию в гене, кодирующем GASR7, в геноме A. Указанный ген может также называться TaGASR7-A1, и его последовательность доступна в GenBank под номером NCBI: KJ000052, а кодирующая последовательность предоставлена в настоящем документе под SEQ ID NO: 25. Аминокислотная последовательность GASR7 представлена под SEQ ID NO: 8.

Предпочтительно указанная мутация представляет собой мутацию, которая в указанном гене дает последовательность, которая кодирует мутантный фермент GASR7 с пониженной активностью. Более предпочтительно мутация представляет собой мутацию, приводящую к полной потере функции GASR7. Полная потеря функции GASR7 может, например, происходить в результате отсутствия полипептида GASR7. Потеря функции GASR7 также может привести к увеличению длины зерна.

В частности, предпочтительно, чтобы мутация представляла собой мутацию, приводящую к получению гена GASR7, кодирующего укороченную форму GASR7, где указанная укороченная форма GASR7 содержит не более 91 аминокислоты, к примеру не более 91 последовательной аминокислоты, из SEQ ID NO: 8. Например, растение пшеницы может содержать мутацию в гене GASR7, приводящую к образованию преждевременного стоп-кодона, например мутацию, приводящую к образованию стоп-кодона в кодоне, кодирующем Trp. В соответствии с одним вариантом осуществления пшеница может содержать мутацию в гене GASR7, приводящую к образованию преждевременного стоп-кодона в кодоне 91 (нуклеотиды 271-273) из SEQ ID NO: 25 или в любом кодоне, расположенном ближе к 5'.

В соответствии с одним вариантом осуществления растение пшеницы может содержать мутацию в гене GASR7, приводящую к образованию преждевременного стоп-кодона в положении, кодирующем аминокислотный остаток № 91 из SEQ ID NO: 8.

Настоящая заявка также относится к приведенным далее вариантам осуществления.

8. Растение пшеницы, несущее мутацию в гене, кодирующем GASR7.

9. Растение пшеницы по варианту осуществления 8, причем растение пшеницы несет мутацию в гене, кодирующем GASR7, что приводит к образованию преждевременного стоп-кодона.

Растительные продукты и способы их получения.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к растительным продуктам из растения ячменя, несущего мутацию в гене HvGS1-3, например из любого из растений ячменя, описанных в настоящем документе выше в разделе "Растение ячменя, несущего мутацию в гене GS1-3". Растительный продукт может представлять собой растение само по себе или его части. Например, растительный продукт может представлять собой зерна ячменя.

В соответствии с одним вариантом осуществления растительный продукт представляет собой солодовую композицию. Солодовая композиция может содержать или состоять из осоложенных растений ячменя или их частей, например осоложенных зерен ячменя, т.е. зерен ячменя из растения ячменя, несущего мутацию в гене HvGS1-3, например любого из растений ячменя, описанных в настоящем документе выше в разделе "Растение ячменя, несущего мутацию в гене GS1-3".

Осоложенные зерна ячменя представляют собой зерна ячменя, которые были подвергнуты стадии прорастания с последующей стадией сушки. Солодовая композиция может содержать или состоять из переработанного солода, например, это может быть "молотый солод" или "мука". Таким образом, указанная солодовая композиция может быть получена способом, предусматривающим стадии

замачивания зерен зерновых, например зерен ячменя;

проращивания зерен злаковых;

сушки указанных проросших зерен злаковых, например сушки в печи при повышенных температурах.

Настоящее изобретение также относится к получению сусла из растения ячменя, несущего мутацию в гене HvGS1-3, например из любого из растений ячменя, описанных в настоящем документе выше в разделе "Растение ячменя, несущее мутацию в гене GS1-3". Сусло представляет собой водный экстракт ячменя, который, например, может быть получен путем затирания солода, несоложенных зерен ячменя и/или несоложенного сырья. "Несоложеное сырье" понимают как содержащее любой источник углеводов, отличный от солода, такой как без ограничения злаковые (например, ячмень, пшеница, кукуруза или рис), либо в виде цельных зерен, либо в виде переработанных продуктов, таких как крупы, патоки или крахмал. Все вышеупомянутое несоложеное сырье большей частью может быть применено в качестве дополнительных источников экстрактивного вещества (патоки обычно дозируют после затирки). Перед затиранием солод обычно измельчают. Несоложеное сырье, которое имеет форму более крупных кусков, например, цельных зерен, как правило, также измельчают.

Несоложенные зерна ячменя не содержат или содержат лишь ограниченное количество ферментов, полезных для производства сусла, таких как ферменты, способные разрушать клеточные стенки или деполимеризовать крахмал на сахара. Таким образом, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, где для затирания применяют несоложенный ячмень, предпочтительно, чтобы в затор был добавлен один или несколько подходящих внешних пивоваренных ферментов. Даже в соответствии с теми вариантами осуществления настоящего изобретения, где для получения сусла применяют зерновой солод, во время затирания можно добавить внешние ферменты. Подходящими ферментами могут быть липазы, ферменты, расщепляющие крахмал (например, амилазы), глюканазы [предпочтительно (1-4)- и/или (1-3,1-4)- $\beta$ -глюканаза], и/или ксиланазы (такие как арабиноксиланаза), и/или протеазы, или смеси ферментов, содержащие один или несколько из вышеупомянутых ферментов, например Cereflo, Ultraflo или Onda Pro (Novozymes).

Затирание, как правило, проводят путем инкубации указанного размолотого солода и/или зерен ячменя и необязательно несоложенного сырья с водой при повышенных заданных температурах. Как правило, затирание выполняют при температуре в диапазоне от 40 до 80°C. Температуру инкубации, как правило, либо поддерживают постоянной (изотермическое затирание), либо постепенно увеличивают. На практике это можно осуществлять, например, последовательно. Если температура клейстеризации выше, что в норме наблюдается при нормальном осахаривании солода, то крахмал можно клейстеризировать и подвергнуть ожигению перед добавлением в затор. В любом случае растворимые вещества в солоде/ячмене/несоложенном сырье высвобождаются в указанную жидкую фракцию. Последующая фильтрация обеспечивает разделение сусла и остаточных твердых частиц, последние также называют "пивной дробинкой". Полученное таким образом сусло также можно называть "первым суслом". В пивную дробину можно добавить дополнительную жидкость, такую как вода, во время процесса, называемого "промывание". После промывания и фильтрации может быть получено "второе сусло". Последующие сусла могут быть получены при повторении процедуры. Неограничивающие примеры подходящих процедур получения сусла описаны в работе Briggs и соавт. (ранее) и в работе Nough и соавт. (ранее).

После затирания и/или промывания сусло может быть подвергнуто стадии кипячения необязательно в присутствии дополнительных соединений, например хмеля, для получения прокипяченного сусла.

Сусло по настоящему изобретению может представлять собой первое сусло, второе сусло, последующие сусла или комбинации вышеупомянутых, а также прокипяченные версии любого из вышеупомянутых.

В соответствии с одним предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения растительный продукт представляет собой напиток, полученный из растения ячменя, несущего мутацию в гене, кодирующем HvGS1-3, например, напиток на основе ячменя, такой как алкогольный напиток на основе ячменя и безалкогольный напиток на основе ячменя. Алкогольные напитки на основе ячменя могут, например, представлять собой пиво или перегнаный алкоголь.

Указанное пиво может быть любым видом пива, например, лагером или элем. Таким образом, пиво можно, например, выбрать из группы, состоящей из альтбира, янтарного эля, ячменного вина, берлинского пшеничного пива, Бьер-де-Гарда, горького пива, блонд эля, пива сорта бок, бурого эля, пива сорта Калифорния Коммон, кремового эля, пива сорта Дортмундер Экспорт, доппельбока, пива сорта Дункель, темного пшеничного пива (Dunkelweizen), айсбока, фруктового ламбика, золотого эля, пива сорта Гозе, пива сорта Хейзе, пшеничного пива (Hefeweizen), пива сорта Хеллес, индийского пейл-эля, пива сорта Кельп, ламбика, светлого эля, майбока, солодового ликера, мягкого пива, мартовского пива (Marzenbier), старого эля, фландрийского коричневого эля (Oud bruin), пейл-эля, пильзнера, портера, красного эля, ржаного пива (Roggenbier), сезонного пива (Saison), шотландского эля, парового пива, стаута, черного пива (Schwarzbier), лагера, белого пива (Witbier), пшеничного нефилтрованного светлого пива (Weissbier) и пшеничного бока (Weizenbock).

Указанный перегнаный алкоголь может представлять собой любой вид перегнанного алкоголя. В частности, в основе перегнанного алкоголя может быть растение ячменя, несущее мутацию в гене HvGS1-3, например осоложенное злаковое, такое как ячменный солод. Неограничивающие примеры такого перегнанного алкоголя включают виски или водку.

Напиток может быть безалкогольным напитком, таким как безалкогольный напиток на основе ячменя, например безалкогольное пиво или безалкогольные солодовые напитки, такие как мальтина.

Напитки могут быть получены, например, с помощью любого из описанных ниже в настоящем документе способов.

Способ получения напитка.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к способам получения напитка. Такие способы могут предусматривать стадии

получения растения ячменя, несущего мутацию в гене HvGS1-3, например любую из мутаций, описанных в настоящем документе выше в разделе "Растение ячменя, несущее мутацию в гене GS1-3";  
получения водного экстракта указанного растения или его частей;  
необязательно последующей переработки указанного водного экстракта в напиток.

Таким образом, настоящее изобретение относится, в соответствии с одним вариантом осуществления, к способу получения напитка, причем указанный способ предусматривает стадии

a) получения зерен растения ячменя, несущего мутацию в гене, кодирующем HvGS1-3, например любую из мутаций, описанных в настоящем документе выше в разделе "Растение ячменя, несущее мутацию в гене GS1-3";

b) необязательно получения солодовой композиции из по меньшей мере части указанных зерен с получением таким образом солода;

c) получения водного экстракта из указанной ячменной и/или солодовой композиции;

d) переработки указанного экстракта в напиток.

Стадию b) можно выполнить так, как описано в настоящем документе выше в разделе "Растительные продукты и способы их получения". А стадия c) может быть, например, стадией получения сусла, т.е. водный экстракт может быть суслом. Указанное сусло может представлять собой любое сусло из описанных в настоящем документе выше в разделе "Растительные продукты и способы их получения"; оно также может быть получено так, как описано в этом разделе.

Стадия d) может предусматривать стадию ферментации указанного водного экстракта, например ферментации указанного сусла дрожжами. Стадия d) может предусматривать стадии

d-i) нагревания экстракта (например, в присутствии дополнительного(ых) ингредиента(ов), такого(их) как хмель);

d-ii) ферментации нагретого экстракта или нагретого сусла в присутствии дрожжей;

d-iii) необязательно добавления одного или нескольких дополнительных ингредиентов с получением тем самым пива.

Указанные дополнительные ингредиенты могут представлять собой, например, CO<sub>2</sub> или ароматические соединения.

Способы получения пива хорошо известны из уровня техники, и, таким образом, способы получения напитка могут представлять собой любой традиционный способ производства пива, предусматривающий применение растения ячменя по настоящему изобретению в качестве сырья. Например, подробные описания примеров подходящих способов осаживания и пивоварения можно найти в том числе в публикациях Briggs и соавт. (1981) и Hough и соавт. (1982). Существует множество регулярно обновляемых способов анализа ячменных, солодовых и пивных продуктов, например, без ограничения от Американской ассоциации специалистов по химическим исследованиям злаковых (1995), Американской ассоциации специалистов по химическим исследованиям пивоварения (1992), по Европейской конвенции о пивоварении (1998) и от Института пивоварения (1997). Общеизвестно, что в заданной пивоварне используют множество конкретных процедур, причем наиболее значительные вариации касаются местных потребительских предпочтений. В соответствии с настоящим изобретением можно применять любой такой способ производства пива.

Настоящая заявка также относится к приведенным далее вариантам осуществления.

10. Дрожжи, несущие мутацию в гене FDC1, что приводит в результате к полной потере функции активности *fdc1*, причем такая мутация приводит к образованию стоп-кодона в кодоне, кодирующем Trp.

11. Дрожжи по варианту осуществления 10, причем дрожжи представляют собой *S. cerevisiae* и указанный *S. cerevisiae* несет мутацию, приводящую к образованию стоп-кодона в кодоне, кодирующем Trp 159 в ScFDC1 у *S. cerevisiae*.

12. Способ получения напитка, причем указанный способ предусматривает стадии

i) получения сусла;

ii) ферментирования указанного сусла дрожжами по любому из вариантов осуществления 10-11;

iii) необязательно последующей переработки ферментированного сусла в напиток.



## Перечень последовательностей.

SEQ ID NO:1	NCBI: AFX60877.1 (HvGS1-3)
SEQ ID NO:2	Регистрационный номер GenBank, NCBI: JX878491.1 – CDS - HvGS1-3
SEQ ID NO:3-6	Праймеры и зонды, различающие мутантный аллель и аллель дикого типа HvGS1-3 в нуклеотидном положении 860
SEQ ID NO:7	Аминокислотная последовательность <i>fdc1</i> из <i>S. cerevisiae</i> (номер GenBank, NCBI: NM_001180847)
SEQ ID NO:8	Аминокислотная последовательность GASR7-A1 из <i>T. aestivum</i> (номер GenBank, NCBI: KJ000052).
SEQ ID NO:9-12	Праймеры и зонды, различающие мутантный аллель и аллель дикого типа TaGASR7 в нуклеотидном положении 273
SEQ ID NO:13-16	Праймеры и зонды, различающие мутантный аллель и аллель дикого типа ScFDC1 в нуклеотидном положении 476
SEQ ID NO:17	кДНК, кодирующая BADH1 из <i>Hordeum vulgare</i> (HvBADH1)
SEQ ID NO:18	кДНК, кодирующая мутантный BADH1 из <i>Hordeum vulgare</i> (HvBADH1)
SEQ ID NO:19	Аминокислотная последовательность BADH1 из <i>Hordeum vulgare</i> (HvBADH1)
SEQ ID NO:20-24	Праймеры и зонды, различающие мутантный аллель и аллель дикого типа TaGASR7 в нуклеотидном положении 273
SEQ ID NO:25	NCBI: KJ000052 – (TaGASR7 –A1)
SEQ ID NO:26	NCBI: NM_001180847 (ScFDC1)

Если не указано иное, все регистрационные номера GenBank приведены относительно версии базы данных GenBank на 1 июля 2016 г.

## Примеры

Настоящее изобретение проиллюстрировано с помощью описания и примеров WS, которые не следует рассматривать как ограничивающие настоящее изобретение. Если не указано иное, для работы с нуклеиновыми кислотами, белками (в том числе с ферментами) и организмами использовали основные биохимические и молекулярно-биологические методики.

Все описанные ниже последовательности действий включают, например, конкретные количества применяемых зерен, конкретную концентрацию и конкретные условия для ПЦР и т.д. Специалист в данной области техники сможет адаптировать конкретные приведенные примеры для использования иного количества зерен, иных концентраций, иных условий ПЦР и т.д.

WS1: получение подвергнутых случайному мутагенезу злаковых зерен.

Стадия 1.1. Процедура мутагенеза.

Для индукции мутаций зерна, собранные у растений ячменя, инкубировали в растворе мутагена  $\text{NaN}_3$  в соответствии с деталями, приведенными в работе Kleinhofs и соавт. (1978) и приведенными в US 7838053, K. Breddam и соавт. С помощью данной процедуры индуцировали точечные мутации в гДНК зерен ячменя, которые, как правило, вносили случайно распределенные кодоны аминокислотных замен или кодоны для остановки трансляции в кодирующую белок ДНК, т.е. приводили к белковым изменениям и укорочениям в белках, кодируемых подвергнутой мутагенезу ДНК. Тем не менее способы по настоящему изобретению также пригодны для получения злаковых растений с точечными мутациями в гДНК не кодирующих белок участках, например промоторах, терминаторах и интронах.

В общей сложности 500 г подвергнутых мутагенезу зерен, все из поколения M0, высевали на участке площадью 7,5 м<sup>2</sup> в полевых условиях. Зерна поколения M1 в некоторых случаях размножали на полевых участках, что в итоге давало мутантные растения поколения M2 или M3 (см. фиг. 2A). Ожидали,

что мутации в зернах поколения МЗ будут встречаться с частотой, соответствующей 0,9-2,3 на 10000 зерен (см. работу Kleinhofs и соавт., полная ссылка на которую приведена ранее).

WS2: получение упорядоченной библиотеки зерен, полученных от мутантных зерновых растений.

Стадия 2.1. Сбор урожая зерновых растений, обмолот колосьев.

Каждый "полевой участок" площадью 7,5 м<sup>2</sup> (FPN<sup>№</sup>01, FPN<sup>№</sup>02 и т.д.; см. фиг. 2B) в поле разделяли на несколько "полевых подучастков" (FSPN<sup>№</sup>01, FSPN<sup>№</sup>02 и т.д.; фиг. 2B, действие, помеченное как 1), каждый с размером 0,45 м<sup>2</sup> и содержащий ~300 отдельных растений. Все колосья на одном подучастке собирали вручную с применением серпа, а затем складывали в один пакет. Содержимое отдельных пакетов обмолачивали по-отдельности, получая пакеты с пометкой "всего зерен", при этом каждый из них содержал ~6000 зерен (GTN<sup>№</sup>01, GTN<sup>№</sup>02 и т.д.; фиг. 2B, действие, помеченное как 2).

В целях ясности описания, а не в качестве ограничения, ниже в примерах приведены детали следующих тем, относящихся к стадии 2:

пример 1 - выращивание растений ячменя на "полевых участках";

пример 2 - сбор зерновых на индивидуальных "полевых участках".

WS3: Определение, содержит ли выборка библиотеки мутантные зерна.

Стадия 3.1. Разделение отдельных пулов зерен "всего зерен" на две фракции.

Молотые зерна в отдельных пакетах "всего зерен" разделяли на две фракции, в которых выборки "всего зерен в подвыборке" состояли из ~1500 зерен (с маркировкой SGTN<sup>№</sup>01, SGTN<sup>№</sup>02 и т.д.; см. фиг. 2C, действие 1), обработка которых подробно описана в стадиях 3.2-3.4 ниже. Обработка зерен во фракциях "всего зерен в подвыборке" в общих чертах направлена на определение того, какая из указанных фракций зерен содержит представляющую(ие) интерес мутацию(и). По причинам ясности, но не относящимся к действиям, связанным со стадией 3, остальную часть фракции "всего зерен", состоящую из ~4500 зерен, обрабатывали так, как подробно описано в описании, относящемся к стадии 4.

В целях ясности описания, а не в качестве ограничения, ниже в примерах приведены детали следующей темы, относящейся к стадии 3.1:

пример 3 - описание зерен в разделе "всего зерен в подвыборке".

Стадия 3.2. Получение образцов муки из зерен "всего зерен в подвыборке".

Каждую выборку по типу "всего зерен в подвыборке", которая содержала 1500 зерен, т.е. выборки обозначенные SGTN<sup>№</sup>01, SGTN<sup>№</sup>02 и т.д., размалывали в стандартной лабораторной мельнице (см. фиг. 2B, действие 2) с тщательной очисткой между применениями с получением соответствующих образцов муки, обозначенных как SFTN<sup>№</sup>01, SFTN<sup>№</sup>02 и т.д. (см. фиг. 2C).

В целях ясности описания, а не в качестве ограничения, ниже в примерах приведены детали следующей темы, относящейся к стадии 3.2:

пример 4 - изготовление муки из зерен, полученных из выборки "всего муки из подвыборки".

Стадия 3.3. Получение гДНК из аликвот муки.

Аликвоты отдельных образцов "всего муки из подвыборки", каждая по 25 г и обозначенная как "аликвота образца муки из подвыборки" (ASFTN<sup>№</sup>01, ASFTN<sup>№</sup>02 и т.д.), распределяли в отдельные емкости (см. фиг. 2C, действие 3).

Затем из каждой аликвоты муки экстрагировали гДНК (см. фиг. 2C, действие 4) и каждую экстрагированную гДНК помещали в одну лунку микротитровального планшета, при этом образцы были обозначены как гДНК (GTN<sup>№</sup>01), гДНК (GTN<sup>№</sup>02) и т.д., обозначая конкретное происхождение "всего зерен" у образца. Альтернативно экстракцию можно было выполнять в лунках микротитровального планшета.

В целях ясности описания, а не в качестве ограничения, ниже в примерах приведены детали следующих тем, относящихся к стадии 3.3:

пример 5 - приготовление аликвот муки массой 25 г (ASFT);

пример 6 - получение кДНК из ASFT.

Стадия 3.4. Анализ образцов, содержащих гДНК из GT.

Затем аликвоты гДНК, полученные из отдельных выборок "всего зерен", переносили в новый 96-луночный микротитровальный планшет (см. фиг. 2C, действие 5), иногда включая два образца отрицательного контроля. Последующий ddPCR-анализ, например, который подробно описан в примере 7, может помочь идентифицировать образцы, содержащие гДНК мутантных растений.

В целях ясности описания, а не в качестве ограничения, ниже в примерах приведены детали следующей темы, относящейся к стадии 3.4:

пример 7 - эксперименты на основе ddPCR с гДНК, полученной из ASFT.

WS4: Поиск отдельного(ых) зерна(ен), характеризующего(их)ся представляющей интерес мутацией.

Стадия 4.1. Особенности "библиотечного пула зерен" (GLP).

Если анализ, например, который подробно описан на стадии 3.4 выше, давал сигнал, указывающий на наличие мутантной гДНК в одном или нескольких из 96 анализируемых образцов, т.е. обозначенных как гДНК (GTN<sup>№</sup>01), гДНК (GTN<sup>№</sup>02) и т.д. на фиг. 2C, с высокой вероятностью признавали, что 4500 зерен из фракции "всего зерен", помеченной как "библиотечный пул зерен" (GLPN<sup>№</sup>01, GLPN<sup>№</sup>02 и т.д.; фиг. 2D, действие 2), содержали одно или несколько зерен с идентичной представляющей интерес мутацией. В настоящей заявке обработка указанных GLP будет относиться к предельным усилиям по поиску

конкретного мутантного зерна, которое содержит ту же мутацию, что и мутация матричной молекулы, детектируемая в подвергаемой обработке аликвоте, полученной из выборки "всего зерен" (фиг. 2B, 2C и 2D), и которая дополнительно служит причиной сигнала о наличии мутации в соответствующем ddPCR-анализе (как проиллюстрировано на фиг. 2C, действие 5).

В целях ясности описания, а не в качестве ограничения, ниже в разделе "Примеры" настоящей публикации приведены детали следующей темы, относящейся к стадии 4.1:

пример 8 - сбор зерен для "библиотечного пула зерен".

Стадия 4.2. Сокращение "библиотечного пула зерен" до "фракции библиотечного пула зерен".

С интактной выборкой GLP, содержащей ~4500 зерен, полученных из одной конкретной GT (и если ddPCR-анализ гДНК, который проиллюстрирован на фиг. 2C, действие 5, показал, что указанная гДНК содержала мутацию в гДНК), обычно было достаточно найти посредством скрининга менее 12 отдельных зерен по конкретной мутации гена, идентичной той, которая была выявлена с помощью анализа на стадии 3.4. По этой причине получали выборку ~1200 зерен представляющего интерес GLP (фиг. 2D, действие 2) с получением "фракции библиотечного пула зерен", сокращенно FGLP. В итоге было выделено 96 выборок, каждая из которых состояла из 12 зерен из определенного FGLP, каждая из которых составляла вторичный подпул.

В целях ясности описания, а не в качестве ограничения, ниже в последующих примерах настоящей публикации приведены детали следующей темы стадии 4.1:

пример 9 - получение "фракции библиотечного пула зерен" из "библиотечного пула зерен".

Стадия 4.3. Разделение зерен и соответствующие образцы муки.

Каждому из 12 зерен в выборке, полученной так, как описано выше на стадии 4.2, наносили повреждение путем просверливания тонкого отверстия в эндосперм. В то время как поврежденные, но жизнеспособные зерна переносили в одну лунку микротитровального планшета с глубокими лунками (фиг. 2D, действие 3), муку, высвобожденную в результате просверливания тех же зерен, объединяли в пул и переносили во второй микротитровальный планшет (фиг. 2D, действие 4). Эту процедуру проводили с оставшимися 95 выборками (с сохранением идентичной системы нумерации двух планшетов), в результате чего получали один микротитровальный планшет с выборками зерна (обозначенными как "пулы просверленных зерен из фракции библиотечного пула", сокращенно PDGLP; см. фиг. 2D) и один микротитровальный планшет с образцами муки из эндосперма (обозначенными "пулы муки из просверленных зерен", сокращенно PFGLP; фиг. 2D).

В целях ясности описания, а не в качестве ограничения, ниже в примерах приведены детали следующих тем, относящихся к настоящей стадии 4.3:

пример 10 - просверливание зерен ячменя;

пример 11 - получение "пулов муки из просверленных зерен".

Стадия 4.4. Получение гДНК из муки эндосперма мутантных растений.

Муку в каждой лунке микротитровального планшета, полученную, как описано выше на стадии 4.3, подвергали отдельной экстракции гДНК (фиг. 2D, действие 5). В указанной экстракции использовали полуавтоматическую процедуру, основанную на рекомендациях, представленных с набором NucleoSpin 96 Plant II (Machery-Nagel), в результате чего получали "пулы гДНК", в которых отдельная лунка микротитровального планшета содержала гДНК, полученную из муки из 12 зерен ячменя.

В целях ясности описания, а не в качестве ограничения, ниже в примерах настоящей публикации приведены детали следующих тем, относящихся к стадии 4.4:

пример 12 - очистка гДНК из муки из просверленных зерен ("пулы гДНК").

Стадия 4.5. Анализ гДНК из мутантных эндоспермов.

Проводили стандартные ddPCR-анализы с образцами гДНК, полученными так, как описано выше для стадии 4.4, в соответствии с рекомендациями, представленными компанией Bio-Rad по использованию капельного ридера QX200 и устройства для создания капель с применением наборов праймеров для тестирования на конкретные представляющие интерес мутации. При условии, что анализ гДНК, полученной из отдельной лунки, от которой получали сигналы, показывал присутствие мутантной ДНК в этом образце (см. фиг. 2D, действие 6), была высокая вероятность того, что одно или несколько зерен, из которых происходила гДНК, будет содержать представляющую интерес мутацию.

В целях ясности описания, а не в качестве ограничения, ниже в разделе "Примеры" настоящей публикации приведены детали следующей темы, относящейся к стадии 4.5:

пример 13 - ddPCR-анализ ДНК муки из просверленных зерен.

Стадия 4.6. Выявление представляющего интерес мутантного зерна В то время как образцы из микротитровального планшета, обозначенного PFGLP, содержали муку (см. стадию 4.3), соответствующие лунки в планшетах, обозначенных PDGLP, содержали 12 соответствующих живых зерен. Следовательно, следующей стадией было выделение выборки, состоящей из 12 представляющих интерес зерен (фиг. 2D, действие 7), а затем их проращивание (фиг. 2D, действие 8).

В целях ясности описания, а не в качестве ограничения, ниже в разделе "Примеры" настоящей публикации приведены детали следующей темы, относящейся к стадии 4.6:

пример 14 - проращивание потенциальных мутантных растений.

#### Стадия 4.7. Проверка признака.

Специалисту-исследователю доступен ряд способов определения, обладает ли потенциальный мутант ожидаемыми признаками, т.е. представляющими интерес признаками. В данном случае гДНК экстрагировали из проросших ростков, идентифицировали и размножали так, как описано в стадии 4.6 выше, и подтверждали с помощью комбинированных анализов с использованием ddPCR и секвенирования ДНК, какой из 12 потенциальных мутантов действительно несет представляющую интерес мутацию (ср. фиг. 2D, действие 9).

В целях ясности описания, а не в качестве ограничения, ниже в разделе "Примеры" настоящей публикации приведены детали следующих тем, относящихся к стадии 4.7:

пример 15 - детали анализов, включая ddPCR и секвенирование ДНК.

WS5: создание и применение "суперпулов" гДНК.

Стадия 5.1. Ультравысокопроизводительное выявление мутантных зерен ячменя.

Настоящее изобретение также относится к комбинированному применению двух различных аналитических платформ для цифровой ПНР, которые улучшают способы выявления малораспространенных мутаций. В данном случае платформу RainDrop, поставляемую на рынок компанией RainDance Technologies, использовали для обнаружения мутаций ДНК в сложных образцах молекул гДНК, полученных из мутантных растений, при этом платформа Bio-Rad предоставляла возможность осуществления способов выявления экстрактов из зерен, полученных из отдельных мутантов ячменя.

В целях ясности описания, а не в качестве ограничения, ниже в разделе "Примеры" настоящей публикации приведены детали следующих тем, относящихся к стадии 4.7:

пример 16 - получение "суперпулов" гДНК;

пример 17 - ddPCR с гДНК полученной из "суперпулов".

В итоге, просто для краткого обзора, WS и соответствующие примеры были расположены следующим образом.

WS2:

пример 1 - выращивание растений ячменя на "полевых участках";

пример 2 - сбор зерновых на индивидуальных "полевых участках".

WS3:

пример 3 - описание зерен в разделе "всего зерен в подвыборке";

пример 4 - изготовление муки из зерен, полученных из выборки "всего муки из подвыборки";

пример 5 - приготовление аликвот муки массой 25 г (ASFT);

пример 6 - получение кДНК из ASFT;

пример 7 - эксперименты на основе ddPCR с гДНК полученной из ASFT.

WS4:

пример 8 - сбор зерен для "библиотечного пула зерен";

пример 9 - получение "фракции библиотечного пула зерен" из "библиотечного пула зерен";

пример 10 - просверливание зерен ячменя;

пример 11 - получение "пулов муки из просверленных зерен";

пример 12 - очистка гДНК из муки просверленных зерен ("пулы гДНК");

пример 13 - ddPCR-анализ ДНК муки из просверленных зерен;

пример 14 - проращивание потенциальных мутантных растений;

пример 15 - подробности о мутантных растениях, выявленных с помощью ddPCR-скринингов.

WS5:

пример 16 - получение "суперпулов" гДНК;

пример 17 - ddPCR с гДНК полученной из "суперпулов".

Примеры.

Пример 1. Выращивание растений ячменя на "полевых участках".

Зерна ячменя подвергали мутагенезу с помощью  $\text{NaN}_3$ , как описано в WS1 выше.

Подвергнутые мутагенезу зерна ячменя размножали на полевых участках площадью 7,5 м<sup>2</sup>.

На каждом участке высевали 250 г зерна и выращивали их до созревания.

Пример 2. Сбор зерновых на индивидуальных "полевых участках".

Во время сбора урожая полевые участки делили на 15-17 подучастков, каждый из которых содержал примерно 300 растений. Растения собирали с использованием серпа, молотили и упаковывали в пакеты - каждый подучасток индивидуально. Таким образом, зерна в одном мешке "всего зерен" были получены от 300 растений.

Пример 3. Описание зерен в разделе "всего зерен в подвыборке".

Все зерна одной выборки "всего зерен" разделяли на 4 рандомизированные фракции равного размера с использованием желобчатого делителя выборки зерен. Каждая фракция представляла собой 25% от общего количества зерен в одной выборке "всего зерен". Одна из этих фракций составляла одну "всего зерен в подвыборке".

Пример 4. Изготовление муки из зерен, полученных из выборки "всего муки из подвыборки".

Все зерна одной выборки "всего зерен в подвыборке" помещали в зерновую мельницу (Retsch, Grin-

doMix GM200). Зерна мололи в течение 30 с на 10000 об/мин. Полученную муку ("всего муки из подвыборки"; ~75 г) помещали в бумажный мешок и хранили при 23°C.

Пример 5. Получение алиquot муки массой 25 г (ASFT).

Из одной выборки "всего муки из подвыборки" взвешивали алиquotу 25 г муки. Алиquotу муки массой 25 г (ASTF) переносили в бумажный мешок и хранили при 23°C.

Пример 6. Получение очищенной гДНК из ASFT.

Одну алиquotу муки массой 25 г (ASTF) переносили в стеклянную бутылку объемом 250 мл и ресуспендировали в 30 мл H<sub>2</sub>O с последующим добавлением нагретых до 65°C 70 мл 2% буфера на основе цетилтриметиламмонийбромид (CTAB), содержащего 1,4 M NaCl, 20 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 100 mM Tris-HCl, доводили до pH 8,0 с помощью 1 M NaOH. После автоклавирования раствора, а затем добавления в него 250 мкл 10 мг/мл РНКазы А и 250 мкл протеиназы К, его инкубировали при регулярном перемешивании для разрушения РНК и белка. Алиquotу объемом 50 мл переносили в пробирку Falcon объемом 50 мл с последующим удалением нерастворимых осадков с помощью центрифугирования на 4000 об/мин в течение 10 мин, после чего 24 мл полученного супернатанта переносили в новую пробирку объемом 50 мл.

После двух последовательных экстракций хлороформом (первая - с 15 мл, вторая - с 12,5 мл) 15 мл водной фазы, содержащей нуклеиновые кислоты, включая гДНК, переносили в пробирку объемом 50 мл, содержащую 30 мл 0,5% буфера СТАВ, приготовленного с 0,04 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, доводили до pH 8,0 с помощью 1 M NaOH. Пробирку переворачивали 6-8 раз и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре перед центрифугированием на 4000 об/мин в течение 10 мин. В то время как водную фазу отбрасывали, осадок, содержащий гДНК, медленно растворяли в 10 мл 1,2 M NaCl в течение ночи при 8°C. Затем проводили экстракцию посредством 10 мл хлороформа перед центрифугированием на 4000 об/мин в течение 15 мин. Из водной фазы 9,5 мл объединяли с 5,5 мл изопропанола и полученный образец осторожно переворачивали 6-8 раз, а затем инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин с последующим осаждением гДНК центрифугированием на 4000 об/мин в течение 10 мин.

Содержащий гДНК осадок промывали посредством 5 мл 70% этанола перед центрифугированием на 4000 об/мин в течение 10 мин, при этом полученный супернатант отбрасывали, а осадок гДНК сушили в течение ~40 мин при комнатной температуре. После добавления 5 мл H<sub>2</sub>O и инкубации в течение 30 мин при 65°C для ресуспендирования гДНК переносили 500 мкл гДНК, полученной из "всего муки из подвыборки", в специальную глубокую лунку объемом 2 мл соответствующего микротитровального планшета. Указанный планшет с образцами различных образцов гДНК, полученных из "алиquot отдельных SFT", обозначали как "очищенная гДНК" и использовался либо для длительного хранения, либо для экспериментального анализа.

Пример 7. Эксперименты на основе ddPCR с г ДНК полученной из ASFT.

ddPCR проводили с использованием системы Droplet Digital PCR QX200 (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями, предоставленными производителем. Специфичные для последовательности праймеры и зонды для аллелей дикого типа и мутантных аллелей были приобретены у Bio-Rad.

Для аналитических целей 5 мкл очищенной гДНК отдельных ASFT, ср. фиг. 2C, или гДНК из дрожжей (полученной так, как описано в разделе WS3 для дрожжей), добавляли к 17-мкл смеси для ПЦР, содержащей 11 мкл 2× ddPCR Supermix для зондов (№ dUTP; Bio-Rad), 900 нМ мишень-специфичного ПЦР-праймера, 250 нМ зондов для детекции мутантов и контрольных зондов, меченных 6-карбокси-флуоресцеином - FAM и гексахлорфлуоресцеином - HEX зондов соответственно. Зонд для детекции мутантов специфически связывается с целевой последовательностью, содержащей мутацию, тогда как эталонный зонд для детекции специфически связывается с последовательностью дикого типа. Реакционную смесь загружали в устройство для создания капель AutoDG Droplet Generator (Bio-Rad) и проводили процедуру создания капель в соответствии с руководством производителя. Капельную эмульсию подвергали термоциклированию с использованием стандартных условий ПЦР: денатурация при 95°C в течение 10 мин, 40 циклов ПЦР при 94°C в течение 30 с и 55°C в течение 1 мин и завершающее удлинение цепи при 98°C в течение 10 мин перед размещением микротитровального планшета на хранение при 8°C. ПЦР-амплификацию в каплях подтверждали с помощью капельного ридера QX200 Droplet Reader (Bio-Rad). Аналитический порог определяли путем сравнения результатов ddPCR дикого типа и без матрицы. Все данные были оценены как превышающие пороговое значение.

Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft, версии v1.7 (Bio-Rad).

Пример 8. Сбор зерен для "библиотечного пула зерен".

Все зерна одной выборки "всего зерен" разделяли на 4 рандомизированные фракции равного размера с использованием желобчатого делителя выборки зерен. Каждая фракция представляла собой 25% от общего количества зерен в одной выборке "всего зерен". Один "библиотечный пул зерен" содержал объединенные в пул зерна из 3 фракций.

Пример 9. Получение "фракции библиотечного пула зерен" из "библиотечного пула зерен".

"Библиотечную фракцию пула зерен" получали путем последовательного забора 96 выборок по 12 зерен в каждой из одного "библиотечного пула зерен", причем каждая выборка из 12 зерен составляла

вторичный подпул.

Пример 10. Просверливание зерен ячменя.

Зерна из "фракции библиотечного пула зерен" разделяли на 96 аликвот, каждая из которых состояла из 12 зерен. Каждую аликвоту с 12 зернами помещали на лист бумаги для взвешивания, а затем последовательно фиксировали парой щипцов, при этом использовали гравировальный станок (Marathon-3, Saeyang Microtech), оснащенный 1,6-миллиметровым сверлом, для просверливания небольшого, 2-3 мм глубиной, отверстия в эндосперме. С помощью вращательного движения перемещали муку из эндосперма на верхнюю часть зерна и окружающую бумагу для взвешивания. Выборки из 12 просверленных зерен помещали в отдельные 2-миллилитровые лунки микротитровального планшета, получая вторичные подпулы просверленных зерен ячменя, также обозначаемые как "пулы просверленных зерен ячменя из фракции библиотечного пула" (фиг. 2D, действие 3). Просверленные зерна хранили при 20°C до последующего анализа.

Пример 11. Получение "пулов муки из просверленных зерен".

96 Образцов муки, каждый из которых представлял собой муку, полученную от 12 просверленных зерен ячменя (как подробно описано в примере 10), переносили в отдельные 1,5-миллилитровые лунки микротитровального планшета ("пулы муки из просверленных зерен"; см. фиг. 2D, действие 4), сохраняя систему нумерации образцов так, чтобы она совпадала с системой у просверленных зерен.

Пример 12. Очистка гДНК из муки просверленных зерен ("пулы гДНК").

Пулы муки из просверленных зерен ячменя, полученные так, как подробно описано в примере 11, подвергали экстракции гДНК с помощью полуавтоматической процедуры экстракции ДНК, которая подробно описана в инструкциях к набору NucleoSpin 96 Plant II (Macherey-Nagel). Соответственно каждая лунка микротитровального планшета содержала гДНК из муки 12 зерен (фиг. 2D, действие 5).

Пример 13. ddPCR-анализ ДНК муки из просверленных зерен.

В то время как испытания WS3, ср. фиг. 2C и примеры 3-7, были направлены на выявление, какой отдельный(ые) образец(ы) из 96 аликвот гДНК в общей сложности представляющих собой гДНК ~6000 мутантных зерен, содержал(и) представляющую интерес нуклеотидную мутацию, последующие WS4-специфические усилия, ср. фиг. 2D, были направлены на точное определение конкретных мутантных зерен.

Как показано на фиг. 2D, действие 6, основное усилие было направлено на определение, какой образец гДНК из 12 различных зерен даст положительный результат теста в ddPCR-анализе. Следовательно, при использовании идентичных условий реакции и параметров анализа, которые описаны в примере 7, можно было различить, какая лунка в микротитровальном планшете содержала представляющую интерес гДНК. Образцы, содержащие одно гетерозиготное мутантное зерно, определяли как имеющие относительное содержание 5% ( $\pm 2,5\%$ ), при этом образцы с 10% ( $\pm 2,5\%$ ) содержали гомозиготное мутантное зерно.

Основываясь на описанных выше аналитических усилиях, можно было выявить и выбрать потенциальные пулы муки и, следовательно, соответствующие пулы зерна с представляющей интерес нуклеотидной мутацией. Гомозиготные и гетерозиготные мутанты переносили в почву в больших горшках и переносили в теплицу для размножения. Все отрицательные саженцы отбрасывали.

Пример 14. Проращивание потенциальных мутантных растений.

Если анализ гДНК из муки из 12 зерен ячменя давал мутантный сигнал (ср. фиг. 2D, действие 6), проращивали соответствующие зерна "пулов просверленных зерен из фракции библиотечного пула" (фиг. 2D, действия 7 и 8).

Пример 15. Подробности о мутантных растениях, выявленных с помощью ddPCR-скринингов.

Содержимое одного "пула просверленных зерен из фракции библиотечного пула", состоящего из 12 просверленных зерен, помещали в 9-миллиметровую чашку Петри (оснащенную 2 листами фильтровальной бумаги (8,5 мм; Whatman), на которые вносили 2 мл H<sub>2</sub>O). После фазы проращивания в течение 96 ч в темноте при 16°C зерна помещали в почву и далее выращивали в контролируемых условиях в течение 7 дней. Затем брали срезы ткани по 2×5 мм с первых листьев и помещали их в пробирки объемом 0,2 мл. 50 мкл раствора для экстракции (Sigma) пипеткой наносили на каждый лист и инкубировали при 95°C в течение 10 мин. Образцы охлаждали до комнатной температуры и смешивали с 50 мкл раствора для разведения (Sigma). Образцы гДНК окончательно получали путем объединения 10 мкл смеси растворов для экстракции/разведения с 30 мкл H<sub>2</sub>O.

Для аналитических целей 5 мкл очищенной гДНК добавляли к 17-микролитровой ПЦР-смеси, содержащей 11 мкл 2× ddPCR Supermix для зондов (№ dUTP; Bio-Rad), 900 нМ мишень-специфических ПЦР-праймеров, 250 нМ мутант-специфических (6-карбоксифлуоресцеин - FAM) и специфических к дикому типу (гексахлорфлуоресцеин - HEX) зондов. Реакционную смесь загружали в устройство для создания капель AutoDG Droplet Generator (Bio-Rad) и проводили процедуру создания капель в соответствии с руководством производителя. Капельную эмульсию подвергали термоциклированию с использованием стандартных условий ПЦР: денатурация при 95°C в течение 10 мин, 40 циклов ПЦР при 94°C в течение 30 с и 55°C в течение 1 мин и завершающее удлинение цепи при 98°C в течение 10 мин перед раз-

мещением микротитровального планшета на хранение при 8°C. ПЦР-амплификацию в каплях подтверждали с помощью капельного ридера QX200 Droplet Reader (Bio-Rad). Тестовый порог определяли путем сравнения результатов ddPCR дикого типа и без матрицы. Все полученные данные были оценены как превышающие пороговое значение. Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft (версии v1.7 Bio-Rad). Один отдельный росток считали гетерозиготным мутантом при условии, что 50% от общего количества положительных событий в ddPCR были получены от мутант-специфического зонда (FAM). Один отдельный росток считали гомозиготным мутантом, если 100% от общего количества положительных событий в ddPCR были получены от мутант-специфического зонда (FAM). Отдельные мутантные растения выращивали до созревания (см. фиг. 1D, действие 9).

Пример 16. Получение "суперпулов" гДНК.

В простом варианте аликвоту (например, 50 мкл) каждого экстракта гДНК из всех 94 "подпулов" одного планшета библиотек объединяли в один "суперпул".

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления суперпулы гДНК дополнительно обогащали перед проведением ddPCR-анализа.

Так, например, 2 мкл гДНК из суперпула можно было амплифицировать в стандартной реакционной смеси для ПЦР, содержащей, например, 10 мкл 5× реакционного буфера Q5 (New England Biolabs), 200 мкМ dNTP, 0,02 ед./мкл высокоточной ДНК-полимеразы Q5, 100 нМ мишень-специфического прямого ПЦР-праймера, 100 нМ мишень-специфического обратного ПЦР-праймера, 100 нМ блокирующего зонда и воды. Затем смесь для ПЦР можно было термоциклировать с использованием стандартных условий для проведения ПЦР в течение примерно 20 циклов ПЦР. Это приводило к образованию обогащенного суперпула гДНК.

Пример 17. ddPCR-анализ гДНК, полученной из "суперпулов".

Для уменьшения использования химических реагентов параллельно с получением улучшенных показателей объема выпуска при скрининге с мутантными зёрнами ячменя было разработано совместное использование двух методик, одна из которых была предоставлена RainDance Technologies (более совершенная в создании капель), а другая - Bio-Rad (превосходящая по количеству одновременно обрабатываемых образцов). В общих чертах технологию RainDance использовали для выявления конкретных, но сложных образцов, которые содержат гДНК-матрицы из многочисленных мутантных зёрен (подробнее в настоящем документе описано ниже в разделе "Процедура А"), в то время как последующие Bio-Rad-анализы помогали выявлять отдельные зёрна, характеризующиеся представляющей интерес мутацией (подробнее в настоящем документе описано ниже в разделе "Процедура В").

Процедура А. ddPCR на основе RainDance с 16 "суперпулами" гДНК.

Сначала с помощью инструмента RainDrop Source создавали капли для отдельных "суперпулов" (например, для 4-8 суперпулов). гДНК, используемую для ddPCR на основе RainDance, могла представлять собой комбинированный экстракт гДНК, или это мог быть обогащенный суперпул гДНК, полученный, как описано в примере 16. Например, аликвоту объемом 20 мкл гДНК из одного "суперпула" или аликвоту объемом 10 мкл обогащенного суперпула гДНК объединяли с 25 мкл супермикса для зондов (Bio-Rad); стабилизатором капель (RainDance); 900 нМ мишень-специфического прямого праймера; 900 нМ мишень-специфического обратного праймера; 120-250 нМ зонда для детекции последовательности дикого типа (VIC); 250-440 нМ зонда для детекции мутантной последовательности (FAM) и H<sub>2</sub>O для доведения до общего объема реакционной смеси 50 мкл. В общей сложности 4-8 отдельных реакционных смесей, представляющих собой 4-8 отдельных "суперпулов" гДНК, вносили в 8-канальный чип Source (RainDance) и обрабатывали на устройстве Source Instrument (RainDance). Всю вышеописанную в настоящем документе процедуру можно повторять для дополнительных "суперпулов", доводя общее количество образцов для последующего анализа до 8-16.

Два 8-луночных стрипа, содержащих капли, образованные из реакционных вышеописанных в настоящем документе смесей, герметизировали, и содержимое амплифицировали, как подробно описано в примере 9 настоящего документа. После этого амплифицированные смеси переносили в устройство Sense Instrument (RainDance) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных RainDrop Analyst.

Те "суперпулы", в которых были выявлены более высокие сигналы, связанные с представляющей интерес мутацией, по сравнению со средним сигналом мутантных событий во всех 16 "суперпулах", определяли как содержащие потенциальную мутантную гДНК.

Процедура В. ddPCR-анализ на основе Bio-Rad- "суперпулов".

ddPCR-анализ проводили на аликвотах каждого из 96 образцов гДНК, которые представляли представляющий интерес "суперпул", что подробно описано в приведенной выше процедуре А, и он показал наличие мутантной матрицы. Анализ проводили так же, как описано выше для WS3 и WS4.

В частности, целью анализа данных был выбор пула зёрен, содержащего заданную представляющую интерес мутацию. Наборы данных в отношении порога индивидуально определяли относительно графиков всех точек данных для всего планшета. Аналитические категории, включая без ограничения графики концентрации целевых молекул, относительного содержания и выявленных мутаций, индивиду-

ально оценивали в отношении отбора кандидатов.

Относительное содержание можно определить следующим образом: [Сигнал от ("зонда для детекции мутантной последовательности")], деленный на [сигналы от ("зонда для детекции эталонной последовательности" + "зонда для детекции мутантной последовательности")].

Полагали, что образцы содержали мутантную ДНК, если наблюдали следующие свойства:

увеличенное относительное содержание;

увеличенный уровень капель с мутантными последовательностями или;

увеличенное количество мутантных событий в масштабе 50% или выше относительно среднего.

Пример 18. Скрининг на основе ddPCR мутантов ячменя с конкретными мутациями в гене глутаминсинтетазы GS1-3.

Растение ячменя, несущее конкретную мутацию, выявляли с помощью способов, описанных в приведенных выше последовательностях действий и примерах. Как описано, способы можно применять для выявления любого мутанта. Выявление конкретной мутации, G→A, приводит к замене остатка Gly на кислоту Asp в положении 287 последовательности изоформы 3 глутаминсинтетазы 1 ячменя (HvGS1-3).

Глутаминсинтетаза.

Глутаминсинтетаза 1 (GS1) является ключевым ферментом, участвующим в ассимиляции азота у высших растений путем катализа конденсации аммония или аммиака и глутамата в глутамин. На богатых азотом почвах избыточная доступность азота может привести к увеличенному накоплению азота при наливе зерна у ячменя, что негативно сказывается на качестве солода. Нокаутные мутации в GS1 могут привести к серьезным нарушениям роста, что подчеркивает важность этого фермента для общей приспособляемости растения (Tomoyuki Yamaya and Miyako Kusano, 2014). У ячменя известны три изоформы GS1 (HvGS1-1, HvGS1-2, HvGS1-3). Из этих трех изоформ ячменя HvGS 1-3 в основном активна в развивающемся зерне и активируется в условиях высокого содержания аммония. Стратегия мутирования была разработана с целью поддержания оптимального развития растений, но с уменьшенной способностью накапливать азот в зерне. Стратегия мутирования сфокусирована на аминокислотных заменах, которые уменьшают ферментативную активность GS1-3. Подходящая аминокислотная замена была выявлена в положении 287 в последовательности белка (SEQ ID белка, NCBI: AFX60877.1 - представлена в настоящем документе как SEQ ID NO: 2). Изменение кодона GGC (нуклеотидов 859, 860, 861; CDS под номером GenBank, NCBI: JX878491.1 - представлены в настоящем документе как SEQ ID NO: 1) на GAC приводит к аминокислотному обмену с глицина на аспарагиновую кислоту в положении 287 в последовательности белка (SEQ ID белка, NCBI: AFX60877.1). Такое аминокислотное изменение будет вводить в последовательность белка отрицательно заряженную аминокислоту. GS1-3 представляет собой декамер, состоящий из двух колец, составленных 5 субъединицами, с аминокислотным остатком 287, расположенным на границе между двумя кольцами и вдали от активного центра. Поэтому выдвинуто предположение, что введение отрицательно заряженной аминокислоты не будет влиять на общую способность катализировать ее реакцию, но вместо этого может уменьшить ферментативную активность посредством структурных изменений в сборке декамера.

ddPCR-анализ.

Был разработан уникальный ddPCR-анализ, позволяющий специфически различать мутантный аллель и аллель дикого типа HvGS1-3 в нуклеотидном положении 860 в кодирующей последовательности дикого типа (номер GenBank, NCBI: JX878491.1). Зонд для детекции мутантной последовательности был комплементарен кодирующей последовательности, содержащей основание А в нуклеотидном положении 860. Зонд для детекции эталонной последовательности был комплементарен кодирующей последовательности, содержащей основание Г в нуклеотидном положении 860. Были разработаны два фланкирующих праймера для амплификации геномной последовательности, окружающей нуклеотид 860 в кодирующей последовательности.

Специально для локуса HvGS1-3 были разработаны следующие праймеры и зонды:

мишень-специфический прямой праймер (SEQ ID NO: 3): 5'-GTGATCAAGAGGCGCATCAA-3';

мишень-специфический обратный праймер (SEQ ID NO: 4): 5'-CAAGTCTCAACTCGCCGTAT-3';

зонд для мутант-специфической детекции (SEQ ID NO: 5): 5'-AAGACAACGAGCGC-3'-меченный 6-карбоксифлуоресцеином (FAM);

зонд для эталон-специфической детекции (SEQ ID NO: 6): 5'-AAGGCAACGAGCGC-3'-меченный гексахлорфлуоресцеином (HEX).

Пул подвергнутых случайному мутагенезу зерен ячменя получали, как описано выше в WS1, с последующим получением упорядоченной библиотеки.

Определение, содержит ли выборка библиотеки мутантные зерна (WS3).

Следующей стадией, как правило, было определение, содержала ли библиотека мутантные зерна, фактически как описано для WS3 и в приведенном выше в настоящем документе примере 7, со следующими особенностями:

Скрининг проводили всего с 376 GLP (т.е. 376 подпулами), представляющими примерно 120000 мутантных растений ячменя. ddPCR проводили фактически так, как описано в примере 7.

Один образец гДНК объемом 5 мкл, полученный из гДНК (GT№377-GT№470), вносили в каждую



лунку, содержащую 17 мкл реакционной смеси для ПЦР, и тщательно перемешивали путем пипетирования вверх и вниз.

Микротитровальный планшет для ПЦР загружали в ридер QX200 Droplet Reader (Bio-Rad) для анализа капель. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft, версии v1.7 (Bio-Rad). Пороговое значение определяли с помощью двумерного графика, задавали его на уровне 2700 и 1500 для амплификации в случае амплитуды канала 1 и канала 2 соответственно. Из результатов сравнения отдельных значений для относительного содержания было видно, что гДНК (GT№380) давала более высокие сигналы, чем любой другой образец, в отношении детектирования мутантов. Относительное содержание гДНК (GT№380) составляло 0,089% в сравнении с 0,0077%, при этом последнее значение представляет собой среднее относительное содержание для всех 94 протестированных образцов гДНК.

Поиск отдельного(ых) зерна(ен), характеризующего(их)ся представляющей интерес мутацией (WS4).

Отдельные зерна ячменя, несущие мутацию гена, выявляли фактически так же, как описано выше в настоящем документе в WS4, включая следующие последовательно упорядоченные особенности.

1. Исходя из результатов анализа гДНК, полученной из GT№377-GT№470 с помощью HvGS 1-3-специфического ddPCR-анализа, считали, что весьма вероятно, что 4500 зерен GLP№380 [соответствующей гДНК положительной выборки (GT№380)] будут содержать одно или несколько зерен с представляющей интерес мутацией гена.

2. FGLP№380 создавали путем последовательного забора 96×12 выборок зерна из GLP№380. Каждую аликвоту с 12 зернами помещали на лист бумаги для взвешивания, а затем последовательно фиксировали парой щипцов, в то же время с помощью гравировального станка (Marathon-3, Saeyang Microtech), оснащенного 1,6-миллиметровым сверлом, просверливали небольшое, 2-3 мм глубиной, отверстие в эндосперм. С помощью вращательного движения перемещали муку из эндосперма на верхнюю часть зерна и окружающую бумагу для взвешивания. Выборки из 12 просверленных зерен помещали в отдельные лунки объемом 2 мл микротитровального планшета, получая вторичный подпул просверленных зерен ячменя PDGLP№380. 96 Образцов муки, каждый из которых представлял собой муку, полученную от 12 просверленных зерен ячменя, переносили в отдельные лунки 1,5-мл микротитровального планшета (PFGLP№380), сохраняя систему нумерации образцов так, чтобы она совпадала с системой у просверленных зерен.

3. Затем PFGLP№380 подвергали экстракции гДНК с помощью полуавтоматической процедуры экстракции ДНК, которая подробно описана в инструкциях к набору NucleoSpin 96 Plant II (Macherey-Nagel). Соответственно каждая лунка микротитровального планшета содержала гДНК из муки 12 зерен.

4. гДНК, полученную из PFGLP№380, анализировали так, как описано выше. Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft (версии v1.7 Bio-Rad). Пороговое значение определяли с помощью двумерного графика и задавали его на уровне 2700 в случае амплитуды канала 1 и 1500 в случае амплитуды канала 2. Из результатов сравнения отдельных значений относительного содержания было видно, что ни одна из выборок PFGLP№380 не содержала мутантного зерна. Поскольку считали весьма вероятным, что GLP№380 содержал мутантное зерно, было решено получить и проанализировать дополнительные выборки путем создания второго FGLP (FGLP№380-2). Это привело к получению PDGLP№380-2 и PFGLP№380-2. гДНК из PFGLP№380-2 анализировали так, как описано выше. Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft (версии v1.7 Bio-Rad). Пороговое значение определяли с помощью двумерного графика и задавали его на уровне 2700 в случае амплитуды канала 1 и 1500 в случае амплитуды канала 2. В микротитровальном планшете были выявлены три отдельные лунки (C02, F04, F05), в которых наблюдали относительное содержание 4,02, 4,11 и 5,55%, что во всех случаях свидетельствовало о наличии трех отдельных гетерозиготных мутантов в 3 независимых лунках PDGLP№380-2.

5. Все 12 зерен из лунок C02 и F04 PDGLP№380-2 проращивали. Собирали листовой материал от всех 24 проростков и подвергали его экстракции ДНК с помощью REDExtract (Sigma Aldrich). гДНК, полученную из образцов листьев, анализировали так, как описано выше. Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft (версии v1.7 Bio-Rad). Пороговое значение определяли с помощью двумерного графика и задавали его на уровне 2700 в случае амплитуды канала 1 и 1500 в случае амплитуды канала 2. У одного проростка, полученного из лунки C02 PDGLP№380-2, наблюдали относительное содержание 41%, что подтверждало наличие гетерозиготного мутанта. У одного проростка, полученного из лунки F04 PDGLP№380-2, наблюдали относительное содержание 39,6%, что подтверждало наличие гетерозиготного мутанта.

6. Дополнительную проверку признака проводили с помощью прямого секвенирования как выявленных мутантов, так и эталонного образца. ДНК экстрагировали из листового материала с помощью процедуры экстракции ДНК REDExtract (Sigma Aldrich). Для секвенирования готовили 50 мкл реакционной смеси для ПНР, которая содержала 1 мкл очищенной гДНК 20 мкл REDExtract (Sigma Aldrich), 500 нМ мишень-специфического прямого праймера, 500 нМ мишень-специфического обратного праймера и воду. Образцы подвергали термоциклированию с использованием следующих условий ПНР: дена-

турация при 94°C в течение 2 мин, 38 циклов ПНР при 94°C в течение 45 с, 58°C в течение 45 с и 72°C в течение 45 с и завершающее удлинение цепи при 72°C в течение 5 мин перед размещением планшета для ПНР на хранение при 8°C. Отдельные ПНР-продукты очищали с помощью набора для очистки NucleoSpin Gel and PCR. Все образцы секвенировали с применением мишень-специфического прямого праймера и мишень-специфического обратного праймера.

7. Оба проростка, которые были выявлены как положительные по мутации в ddPCR-анализе, были гетерозиготными по отношению к генотипу в заданном геномном местоположении. У эталонного образца наблюдали гомозиготный генотип дикого типа в том же местоположении.

Пример 19. Анализы рекомбинантных форм глутаминсинтазы ячменя.

Синтез трех рекомбинантных вариантов HvGS1-3 с использованием клеток-хозяев *E.coli* с последующим обогащением ферментом до высокой степени чистоты путем аффинной очистки. У *E.coli* экспрессировались следующие варианты:

Q: эталон дикого типа - SEQ ID NO: 1;

3864: SEQ ID NO: 1 с аминокислотной заменой G287D, т.е. соответствующая мутантному белку, который экспрессируется мутантным растением ячменя (выявленным так, как описано в примере 18);

LR: SEQ ID NO: 1 с аминокислотной заменой D300N, т.е. вариант фермента, в котором ожидали, что замена окажет незначительное влияние на ферментативную активность.

Активности трех вариантов HvGS1-3 определяли, прослеживая синтез глутамилгидроксамата из глутамата, гидроксиламина и АТФ в присутствии фермента. Кинетику фермента определяли для всех трех вариантов HvGS1-3 при различных концентрациях глутамата и гидроксиламина, результаты показаны соответственно в табл. 1 и 2.

Тогда как  $k_{cat}$  и  $k_{cat}/K_M$  для HvGS1-3 Q и LR были схожими, у 3864 HvGS1-3 постоянно обнаруживали значения, которые были на один или два порядка ниже по сравнению с остальными двумя вариантами. Из данных по кинетике видно, что мутация, выявленная в 3864 HvGS1-3, Gly 287 на Asp, оказывала серьезное влияние на связывание и утилизацию любого субстрата у этого варианта. Значения кинетики связывания и утилизации АТФ нельзя было определить из-за высокой степени изменчивости поглощения при высоких концентрациях субстрата нуклеотида.

Таблица 1  
Ферментативная кинетика вариантов HvGS1-3 в присутствии различных концентраций глутамата

	Q (0,1)	LR (0,1)	3864 (0,5)
$K_M$ (мМ)	8,68	13,93	63,41
$v_{max}$ (мМ мин <sup>-1</sup> мкг <sup>-1</sup> )	0,66	0,58	0,20
$k_{cat}$ (мин <sup>-1</sup> )	6,6	5,8	0,4
$k_{cat}/K_M$ (мМ мин <sup>-1</sup> )	0,76	0,42	0,01

В отношении Q, LR и 3864 цифры в скобках обозначают общее количество в мкг белка в реакционной смеси.

Таблица 2  
Ферментативная кинетика вариантов HvGS1-3 в присутствии различных концентраций субстрата гидроксиламин

	Q (0,1)	LR (0,1)	3864 (0,5)
$K_M$ (мМ)	2,79	2,58	3,68
$v_{max}$ (мМ мин <sup>-1</sup> мкг <sup>-1</sup> )	0,64	0,53	0,11
$k_{cat}$ (мин <sup>-1</sup> )	6,4	5,3	0,22
$k_{cat}/K_M$ (мМ мин <sup>-1</sup> )	2,29	2,05	0,06

В отношении Q, LR и 3864 цифры в скобках обозначают общее количество в мкг белка в реакционной смеси.

Для определения, была ли затронута олигомеризация комплекса GS1-3 в любом из двух вариантов относительно Q, аликвоту очищенного HvGS1-3 сначала прогоняли через колонку для эксклюзионной хроматографии. Все три варианта имели основной пик при одинаковом элюирующем объеме.

Ниже описан подробный 6-стадийный отчет об экспериментах, которые были поставлены для получения результатов, описанных в настоящем примере.

Стадия 1. Разработка последовательности гена HvGS1-3 для гетерологичной экспрессии гена.

Кодирующую последовательность изоформы GS1-3 глутаминсинтазы ячменя (HvGS1-3), депонированной в GenBank под регистрационным номером JX878491.1, использовали в качестве основы для синтеза 3 соответствующих генных последовательностей (GenScript, Китай), представляющих либо HvGS1-3 дикого типа (Q), либо две формы, содержащие мутации (3864 или LR). Генные и белковые по-

следовательности GS1-3 дикого типа представлены в настоящем документе соответственно под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. Кодирующие белок последовательности ДНК всех трех вариантов встраивали в плазмиду pET-28a(+) для экспрессии у *E.coli*, приобретенную у MerckMillipore (Германия), с последующей трансформацией клеток *E.coli* штамма BL21 (DE3) с помощью стандартных способов.

Стадия 2. Гетерологичная экспрессия HvGS1-3.

Использовали клетки BL21(DE3) *E.coli*, трансформированные HvGS1-3 Q или ее вариантами в pET-28a(+). Бактерии культивировали в среде LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина, в стандартных условиях. Экспрессию гена индуцировали добавлением 250 мкМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (IPTG, Sigma- Aldrich). Экспрессию проводили при 37°C в течение 4 ч при 120 об/мин. Клетки собирали центрифугированием на 4000×g в течение 15 мин при 8°C. В то время как супернатант отбрасывали, клеточные осадки ресуспендировали в 10 мл буфера А (20 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 500 мМ NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>). Ресуспендированные клетки замораживали при -20°C до дальнейшего применения.

Стадия 3. Клеточный лизис клеток BL21 (DE3) *E.coli* после экспрессии рекомбинантного гена.

Трансформированные замороженные клетки BL21 (DE3) *E.coli* сначала оттаивали, а затем разрушали с помощью ультразвукового устройства Vibra (Sonics & Materials Inc., США) с амплитудой 30% в течение 90 с с 5-секундными импульсами и 5-секундными перерывами на натуральном льду. После обработки ультразвуком ДНК расщепляли в течение 10 мин с применением 5 мкг/мл ДНКазы I (Sigma-Aldrich). Лизированные клетки удаляли центрифугированием в течение 10 мин на 13000×g и при 4°C. Супернатант пропускali через 0,45-микрометровый фильтр шприца в новую пробирку.

Стадия 4. Увеличение содержания HvGS1-3 с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом.

1-миллилитровую колонку для аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом (IMAC), загруженную раствором никеля, промывали пятью объемами колонки дважды дистиллированной водой и уравнивали тем же объемом буфера А (композиция которого подробно описана выше). Отфильтрованную растворимую фракцию вводили инъекцией вручную в уравновешенную колонку с помощью шприца, причем несвязанный материал собирали и хранили при 4°C. Плохо связавшийся с колонкой материал вымывали с применением буфера А, содержащего 50 мМ имидазола (Sigma-Aldrich), на протяжении 10 объемов колонки (CV). HvGS1-3 элюировали и собирали в схожих условиях, применяя буфер А, содержащий 400 мМ имидазола, на протяжении 10 CV. Растворы элюированного белка подвергали диалитации

4× на центрифужном фильтре, изготовленном из регенерированной целлюлозы с номинальным молекулярным пределом 10000 (Millipore, Ирландия), против буфера А [центрифугированием на 3000×g (SL-16R) при 8°C в течение 20 мин для удаления избытка имидазола].

Стадия 5. In vitro анализ активности рекомбинантного HvGS1-3.

Для определения изменений активности двух вариантов HvGS1-3 (по сравнению с активностью HvGS1-3Q) использовали адаптацию анализа активности, описанного Wellner и Meister (1966). Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ АТФ, различные концентрации γ-глутамата гидроксиламина (в случае варьирования содержания L-глутамата; в противном случае 50 мМ), различные концентрации L-глутамата (в случае варьирования содержания глутамата гидроксиламина; в противном случае 50 мМ). Реакции ставили в 96-луночном микропланшете с половинным объемом лунки с плоским дном (Corning, США), уравновешенным до 37°C. Реакцию инициировали добавлением очищенного HvGS 1-3 в конечной концентрации 1 или 5 мкг/мл. Спустя 30 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 370 мМ Fe(III)Cl<sub>3</sub>, 200 мМ ТСА, 670 мМ HCl. Затем измеряли A<sub>540</sub> нм снизу на микропланшетном ридере SpectraMax 340PC384 (Molecular Devices, США) с применением коррекции траектории для учета незначительных различий в объеме. Из данных строили график с использованием GraphPad Prism (версии 4, GraphPad Software, США).

Стадия 6. Эксклюзионная хроматография.

Равные количества трех вариантов HvGS1-3 загружали по отдельности в колонку для 10/300 эксклюзионной хроматографии, содержащую Superdex 200 (GE Life Sciences, США), и уравнивали в буфере А на устройстве для FPLC (жидкостной хроматографии быстрого разрешения) ÄKTA (GE Life Sciences). Элюирование связанного белка проводили на скорости 0,5 мл/мин, а после элюирования белка измеряли A<sub>280</sub>.

Пример 20. ddPCR-анализы с гДНК, полученной от подвергнутых мутагенезу дрожжевых клеток.

В целях ясности описания, а не в качестве ограничения в примерах настоящей публикации приведены детали следующих тем:

- часть 1: получение подвергнутой случайному мутагенезу культуры дрожжей;
  - часть 2: получение упорядоченной библиотеки;
  - часть 3: выявление лунки, содержащей гДНК с предопределенной мутацией;
  - часть 4: увеличение содержания дрожжевых клеток, характеризующихся заданной мутацией.
- WS1: получение подвергнутой случайному мутагенезу культуры дрожжей.

### Стадия 1.1. Процедура мутагенеза.

Для индукции появления мутаций штамм дрожжей подвергали обработке MNNG (метилнитронитрозогуанидином) в соответствии с протоколом, описанным в *Methods in Molecular Biology, Yeast Protocols*, V. 313, 2006.

MNNG представляет собой мутаген, который известен как алкилирующий гуанидин или тимин в гДНК с последующим переходом пары G-C в A-T при репликации гДНК. Способ, описываемый в настоящем разделе, предназначен для выявления точечной мутации в представляющем интерес гене, которая изменяет определенный аминокислотный кодон, делая его преждевременным стоп-кодоном. Специалист в настоящей области техники сможет адаптировать данный способ для выявления других видов мутаций. Таким образом, точечная мутация приводит к образованию укороченного и соответственно нефункционального или дефектного белка. Необходимые точечные мутации для создания стоп-кодона определяли на основе последовательности целевого гена/белка. С помощью данного способа также можно выявить другие точечные мутации, затрагивающие регуляторные участки представляющего интерес гена.

Мутагенез осуществляли на культуре дрожжей, например, с общим количеством клеток  $2 \times 10^7$ . Для обеспечения требуемой частоты мутаций определяли и корректировали мутаторное состояние дрожжевых клеток для мутагенеза. Условия мутагенеза, как правило, корректировали до получения выживаемости 60-70%. Концентрацию мутагена и время воздействия варьировали в зависимости от штамма дрожжей.

WS2: получение упорядоченной библиотеки.

### Стадия 2.1. Жизнеспособность клеток.

Определяли титр жизнеспособных клеток и все подвергнутые мутагенезу дрожжевые клетки инокулировали в аликвотах в 96-луночные планшеты с YPD с помощью роботизированного устройства Biomek FXp. На каждую лунку инокулировали 3000-5000 жизнеспособных отдельных клеток.

WS3: выявление лунки, содержащей гДНК с предопределенной мутацией.

### Стадия 3.1. Получение библиотеки подвергнутых мутагенезу дрожжевых клеток.

Подвергнутые мутагенезу дрожжевые клетки, инокулированные в 96-луночные планшеты, со стадии 1.1 рассматривали как общую библиотеку, которая содержала целевые мутантные дрожжи. Дрожжевые клетки инкубировали в течение 3 дней для обеспечения насыщения роста. Библиотеку размножали путем повторной инокуляции в минимальную ростовую среду с помощью роботизированного устройства Biomek FXp (стадия копирования) для применения для выделения гДНК спустя 3 дня роста. Остальную часть суспензии дрожжевых клеток в 96-луночных планшетах консервировали глицерином (конечная концентрация 15%) при  $-80^{\circ}\text{C}$  для последующего применения для выделения требуемых мутантных дрожжей.

### Стадия 3.2. Выделение гДНК из дрожжей.

Для получения гДНК дрожжевые клетки переносили в 96-луночный планшет для выделения ДНК и подвергали процедуре выделения ДНК с применением роботизированных устройств (Biomek FXp, набор Agencourt DNAdvance и протокол от Beckman Coulter). Процедура соответствовала инструкциям производителя с дополнительной стадией применения фермента литиказы (Lyticase) для расщепления клеточной стенки дрожжей и разрушения клеток. Протокол предусматривал осаждение гДНК с помощью магнитных микроносителей. гДНК в 96-луночном планшете использовали для последующего применения с целью выявления положительного пула по заданной мутации. Концентрацию ДНК измеряли с помощью ридера для 96-луночных планшетов, при этом концентрацию ДНК доводили до 25 нг/5 мкл и использовали непосредственно для ddPCR. ДНК в изначальной концентрации в 96-луночных планшетах сохраняли для последующего применения.

### Стадия 3.3. Анализ образцов методом ddPCR.

Количественно оценивали гДНК, полученную на стадии 2.2 в формате 96-луночного планшета, и доводили концентрацию до 25 нг/5 мкл. Включали образцы ДНК положительного и отрицательного контролей. Последующий ddPCR-анализ проводили на каждом образце гДНК фактически так, как описано в примере 7. Для повышения вероятности выявления мутанта на этом этапе можно было внести массив зондов, распознающих в нескольких или во всех возможных положениях в генной последовательности различные точечные мутации, которые создают преждевременный стоп-кодон. Данный способ позволял выявлять лунки, положительные по необходимой мутации, т.е. лунки, содержащие дрожжи, несущие необходимую мутацию.

WS4: увеличение содержания дрожжевых клеток, характеризующихся заданной мутацией.

### Стадия 4.1. Получение объединенной в пул библиотеки дрожжей.

96-луночный планшет, содержащий лунку, положительную по мутации, размораживали, а дрожжевые клетки восстанавливали путем инокуляции содержимого положительной лунки в свежий бульон YPD (1:10) и инкубировали в течение 4-6 ч с вращательными движениями при комнатной температуре. Для того чтобы обеспечить отсутствие дальнейшей пролиферации дрожжевых клеток, восстановленную дрожжевую культуру хранили в холодильнике до последующего посева и успешного завершения выде-

ления чистой мутантной культуры. Перед посевом жизнеспособные дрожжевые клетки подсчитывали и разводили посредством PBS, содержащим 1 мМ ЭДТА, а затем высевали на квадратные чашки Qrix с агаром YPD для получения 2000-3000 колоний на чашку. Количество чашек для получения таким способом зависит от титра жизнеспособных дрожжевых клеток после восстановления из замороженной исходной культуры и от прогресса выявления мутанта. Например, 10-12 планшетов Qrix можно инокулировать до 50000 отдельных клеток, которые дают начало отдельным колониям. Выявление положительного пула, описанного в части 3, с соотношением дикий тип:мутант до 1:5000 позволяло предположить, что среди 50000 отдельных клеток по меньшей мере 10 клеток являются целевым мутантом. Рост колоний отслеживали для обеспечения надлежащего размера и расстояния между колониями, чтобы можно было отбирать отдельные колонии с помощью роботизированного устройства Qrix. Как только колонии были готовы для отбора, создавали библиотеку из 96-луночных планшетов с выращенными на YPD дрожжевыми клетками следующим образом: колонии из всех планшетов Qrix случайным образом собирали в десять 96-луночных планшетов, таким образом, каждая лунка содержала пул из 50 колоний с минимальным потенциальным соотношением дикий тип:мутант, равным 1:50. Эти планшеты подвергали дополнительной обработке для выделения гДНК, а также для создания замороженной исходной культуры и хранили при -80°C для последующего дополнительного применения, как описано для стадии 3.1 (WS3).

Стадия 4.2. Выделение дрожевой гДНК из объединенной в пул библиотеки.

Для получения гДНК из пулов 50 выделенных колоний дрожжевые культуры в 96-луночном планшете, полученные на стадии 3.1, повторно инокулировали в свежую минимальную ростовую среду. При достижении достаточного роста дрожжевые культуры подвергали процедуре выделения ДНК с применением роботизированных устройств, как описано для стадии 3.2 (WS3). Концентрацию ДНК измеряли с помощью ридера для 96-луночных планшетов, и концентрацию ДНК доводили до 25 нг/5 мкл, и использовали аликвоту непосредственно для ddPCR. Исходную концентрированную гДНК консервировали в формате 96-луночных планшетов. гДНК в 96-луночном планшете использовали для последующего применения с целью выявления положительного пула по заданной мутации. Всего получали 10 96-луночных планшетов с гДНК.

Стадия 4.3. Анализ образцов методом ddPCR.

Количественно оценивали гДНК, полученную на стадии 3.2, в формате 96-луночного планшета и доводили концентрацию до 25 нг/5 мкл. Включали образцы ДНК положительного и отрицательного контролей. Последующий ddPCR-анализ проводили на каждом образце гДНК фактически так, как описано в примере 7. Если на стадии 3.3 применяли несколько зондов, то на этой стадии применяли только такой(ие) зонд(ы), который(е) давал(и) положительное выявление положительного пула на стадии 3.3. Данный способ позволял выявлять положительный подпул(ы) с заданной мутацией.

Стадия 4.4. Получение библиотеки дрожжей из отдельных колоний.

Для посева с целью выращивания отдельных колоний применяли замороженный 96-луночный планшет с положительной(ыми) лункой(ами), выявленной(ыми) на стадии 4.3. Дрожжевую культуру из положительной лунки инокулировали в свежий бульон YPD и выращивали в течение ночи. Для получения отдельных колоний высевали 1000 клеток на агар с YPD (формат квадратной чашки Qrix). Выращенные колонии отбирали роботизированным устройством Qrix в десять 96-луночных планшетов с бульоном с YPD в качестве ростовой среды. Эти планшеты подвергали дополнительной обработке для выделения гДНК, а также для создания замороженной исходной культуры для последующего дополнительного применения, как описано для стадии 3.1 (WS3).

Стадия 4.5. Выделение гДНК из библиотеки из отдельных колоний гДНК получали так, как описано для стадии 4.2.

Стадия 4.6. Анализ образцов методом ddPCR.

Количественно оценивали гДНК, полученную на стадии 4.5, т.е. в формате 96-луночного планшета, и доводили концентрацию до 25 нг/5 мкл. Включали образцы ДНК положительного и отрицательного контролей. Последующий ddPCR-анализ проводили так, как описано в примере 7. На этом этапе применяли только такой(ие) зонд(ы), который(е) давал(и) положительное выявление на стадии 3.1. Данный способ позволял выявлять чистую дрожжевую культуру с заданной мутацией. Данный способ позволял определить гомозиготный или гетерозиготный статус изолята.

Стадия 4.7. Выделение чистой культуры мутантных дрожжей.

Для получения исходной культуры мутантных дрожжей суспензию дрожжей из положительной(ых) лунки(ок) высевали на агар с YPD для достижения роста выделенных колоний. Отбирали вручную 3 колонии и дополнительно обрабатывали как биологические копии.

Стадия 4.8. Секвенирование целевого гена или представляющего интерес участка гДНК.

Мутантные изоляты дрожжей с выявленной мутацией, полученные на стадии 4.7 (WS4), применяли для выделения гДНК с последующей специфической ПНР, клонированием полученного фрагмента ДНК и проведения секвенирования ДНК для подтверждения сущности мутации.

Стадия 4.9. Функциональность мутации.

Дрожжевой мутант с представляющей интерес гомозиготной мутацией применяли непосредственно для подтверждения того, что мутация оказывает ожидаемый эффект. Если определяли гетерозиготный

статус и находили его недостаточным для получения ожидаемого эффекта, то либо повторяли мутагенез, либо дрожжевой изолят подвергали споруляции с последующей сегрегацией мутации для подтверждения гомозиготного статуса и мутантного фенотипа. Дрожжевой изолят с представляющей интерес мутацией применяли непосредственно для прикладной задачи или его применяли в селекции дрожжей для контроля требуемого фенотипа.

#### Пример 21.

У *Saccharomyces cerevisiae* декарбоксилаза Fdc1 феруловой кислоты необходима для декарбоксилирования ароматических карбоновых кислот, в том числе коричной или кумаровой кислоты. В результате реакции декарбоксилирования субстраты превращаются в их соответствующие винильные производные, некоторые из которых, как известно, являются активными ароматическими соединениями. Например, во время сбраживания пива Fdc1 превращает феруловую кислоту из сусла в 4-винилгваякол, который становится заметным в виде гвоздичных нот в конечном пиве. Хотя эти ноты типичны для некоторых сортов пива, особенно для немецких пшеничных сортов пива, в других сортах, в том числе в пиве лагер, они считаются фенольными посторонними привкусами (POF). В настоящем документе описано выявление *S. cerevisiae*, несущих нонсенс-мутацию в гене ScFDC1, с помощью не ГМО способов. Ожидали, что выявленные дрожжи будут POF-отрицательным штаммом дрожжей.

В пищевой промышленности применение молекулярно-генетических методик для модификации выбранных организмов является нежелательным, и люди полагаются на применение классических методик случайного мутагенеза и длительных скринингов с целью выявления представляющих интерес штаммов. Описанный ниже способ представляет собой менее трудоемкую методику выявления штаммов, несущих отобранную представляющую интерес мутацию в популяции подвергнутых случайному мутагенезу организмов. Более конкретно, в этом примере описаны штаммы дрожжей, несущие конкретную нонсенс-мутацию (W159\*), полученную в результате G-A перехода в положении +476 гена у штамма FS0105 ScFDC1 у *S. cerevisiae* var. *diastaticus*. Последовательность гена ScFDC1 доступна в GenBank под номером NCBI: NM\_001180847, последовательность кДНК представлена в настоящем документе под SEQ ID NO: 26, а аминокислотная последовательность fdc1 представлена под SEQ ID NO: 7.

WS1: получение подвергнутой случайному мутагенезу популяции дрожжевых клеток FS0105.

#### Стадия 1.1. EMS-мутагенез на штамме FS0105.

Для индукции появления мутаций дрожжевой штамм FS0105 подвергали обработке этилметансульфонатом (EMS) в соответствии с протоколом, описанным в разделе "Способы в генетике дрожжей" (CSHL Press, 2000). Вкратце штамм FS0105 выращивали в течение ночи в среде YPD до стационарной фазы. Клетки собирали с помощью центрифугирования и промывали один раз стерильной дистиллированной водой и один раз 0,1 М натрий-фосфатным буфером (pH 7). Наконец, клетки ресуспендировали в 0,1 М фосфатном буфере до приблизительно  $2 \times 10^8$  клеток/мл. 30 мкл EMS добавляли к 1 мл клеток в реакционной пробирке объемом 2 мл с замком безопасности и клетки инкубировали в течение примерно 75 мин при 30°C и на 1000 об/мин на термомиксере Eppendorf Thermomixer comfort (1,5 мл), что обычно приводило к степени гибели ~60-80% для штамма FS0105. Для остановки мутагенеза клетки осаждали коротким центрифугированием и трижды промывали свежеприготовленным стерильным 5%-ным раствором тиосульфата натрия и один раз стерильной дистиллированной водой. Наконец, клетки ресуспендировали в 1 мл YPD и инкубировали в течение 1 ч при 30°C и 1000 об/мин на термомиксере Eppendorf Thermomixer comfort (1,5 мл). На этой стадии клетки можно хранить при 4°C или сразу же применять для последующих процессов, например для определения степени гибели путем посева на сложную среду.

В литературе высказано предположение, что воздействие на подвергнутые мутагенезу дрожжевые клетки селективным давлением сразу после мутагенеза приведет к значительному увеличению количества мутаций на клетку (Lada и соавт., 2013; Den Abt и соавт., 2016), что может значительно снизить количество дрожжевых клеток, подлежащих скринингу для выявления представляющей интерес мутации. Поэтому примерно  $2 \times 10^7$  живых, но подвергшихся мутагенезу клеток на чашку высевали на чашки со средой SD, содержащие 2 мкг/мл гербицида метсульфурон-метил, и инкубировали чашки в течение нескольких дней при 30°C до тех пор, пока на селективных чашках не появлялись устойчивые к гербицидам колонии. Нашей целью было итого примерно 50000 устойчивых к гербицидам колоний. Для дальнейшего увеличения количества мутаций на клетку с чашек смывали устойчивые к гербицидам клетки стерильным 0,1 М натрий-фосфатным буфером (pH 7), разводили их до примерно  $2 \times 10^8$  клеток/мл и повторяли EMS-мутагенез так, как описано выше. Этот цикл мутагенеза и отбора повторяли в общей сложности четыре раза.

WS2: получение случайной библиотеки подвергнутых случайному мутагенезу дрожжевых клеток FS0105.

#### Стадия 2.1. Создание общей случайной библиотеки подвергнутых мутагенезу дрожжевых клеток FS0105.

После четвертого и последнего раунда EMS-мутагенеза (см. стадию 1.1) определяли титр жизнеспособных клеток путем посева соответствующих разведений на чашки со сложной средой. После этого примерно 1200-1500 живых клеток/чашку распределяли по чашкам с YPD и инкубировали чашки Петри

при 30°C в течение трех дней. Из 96 отдельных чашек клетки смывали посредством 3 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера для каждой с получением 96 "библиотечных пулов". Примерно  $5 \times 10^7$  клеток из этих библиотечных пулов впоследствии применяли для выделения ДНК (см. ниже), в то время как оставшиеся клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 40% глицерине/10% YP и замораживали при -80°C для создания "общей случайной библиотеки" из 96 библиотечных пулов, содержащих итого примерно 120000-150000 подвергнутых EMS-мутагенезу клонов FS0105.

WS3: выявление библиотечных пулов, содержащих клоны с выбранной нонсенс-мутацией Scfcd1 в общих случайных библиотеках FS0105.

Стадия 3.1. Выделение геномной ДНК дрожжей из общей случайной библиотеки FS0105.

Геномную ДНК из каждого пула общей случайной библиотеки выделяли с применением набора для выделения геномной ДНК PureLink® Pro 96 (Invitrogen) и EveryPrep™ Universal Vacuum Manifold (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию ДНК каждого образца определяли с применением NanoDrop 10003.8.1 и растворы ДНК доводили до конечной концентрации 5 нг ДНК/мкл посредством стерильной, не содержащей ДНКаз воды. Образцы ДНК хранили в 96-луночном планшете для ПНР при -20°C до дальнейшего применения.

Стадия 3.2. Анализ образцов гДНК библиотечных пулов методом ddPCR.

Был разработан уникальный ddPCR-анализ, позволяющий специфически различать мутантный аллель и аллель дикого типа ScFDC1 в нуклеотидном положении +476 в кодирующей последовательности дикого типа штамма FS0105. Соответствующий кодон TGG идентичен последовательности ScFDC1 обычного лабораторного эталонного штамма S288C в этом положении (номер GenBank, NCBI: NM\_001180847). Зонд для детекции мутантной последовательности был комплементарен кодирующей последовательности, содержащей основание А в нуклеотидном положении +476. Зонд для детекции эталонной последовательности был комплементарен кодирующей последовательности, содержащей основание G в нуклеотидном положении +476. Были разработаны два фланкирующих праймера для амплификации геномной последовательности, окружающей нуклеотид +476 в кодирующей последовательности. Данный анализ был разработан с применением инструментария для разработки под названием Bio-Rads Droplet Digital PCR Assays для детекции мутаций. Для конкретного локуса ScFDC1 были разработаны следующие праймеры и зонды:

мишень-специфический прямой праймер (5'-CATGTTTCAGACGGTGG-3') (SEQ ID NO: 13);

мишень-специфический обратный праймер (5'-CATACCTCTAGCAATTGACC-3') (SEQ ID NO: 14);

зонд для детекции мутантной последовательности (5'-ACGTACGGAATGTAGATTCT-3') (SEQ ID NO: 15) - меченный 6-карбоксифлуоресцеином - FAM;

зонд для детекции эталонной последовательности (5'-ACGTACGGAATGTGGATT-3') (SEQ ID NO: 16) - меченный гексахлорфлуоресцеином - HEX.

Следующей стадией, как правило, было определение, содержала ли библиотека мутантные штаммы дрожжей. Скрининг проводили итого с 96 библиотечными пулами дрожжей, каждый из которых содержал 1200-1500 подвергнутых мутагенезу колоний дрожжей и представлял итого примерно 120000-150000 мутантных штаммов дрожжей. ddPCR проводили фактически так, как описано в примере 7. Образцы гДНК объемом 5 мкл гДНК из 96 пулов подвергнутых мутагенезу штаммов дрожжей вносили в каждую лунку микротитровального планшета, содержащую 17 мкл реакционной смеси для ПЦР, и тщательно перемешивали путем пипетирования вверх и вниз.

Микротитровальный планшет для ПЦР загружали в ридер QX200 Droplet Reader (Bio-Rad) для анализа капель. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft, версии v1.7 (Bio-Rad). Пороговое значение определяли с помощью двумерного графика, задавали его на уровне 2700 и 1500 для амплификации в случае амплитуды канала 1 и канала 2 соответственно. Из результатов сравнения отдельных значений для относительного содержания было видно, что гДНК с координатами G01 на планшете давала более высокий сигнал, чем любой другой образец, в отношении детектирования мутантов. Относительное содержание пула G01 гДНК составляло 0,190% в сравнении с 0,030%, при этом последнее значение представляет собой среднее относительное содержание для всех 96 протестированных образцов гДНК.

WS4: выявление отдельных клонов дрожжей, несущих выбранную мутацию Scfcd1, путем создания последующих подпулов.

Стадия 4.1. Создание подпулов с сотнями колоний из общей случайной библиотеки FS0105.

На основании результатов анализа 96 образцов библиотечных пулов гДНК, проанализированных с помощью ScFDC1-специфичного ddPCR-анализа, было с высокой вероятностью признано, что 1200-1500 штаммов дрожжей в пуле G01 будут содержать один или несколько отдельных клонов, несущих представляющую интерес генную мутацию.

Титр клеток положительного библиотечного пула G01, выявленного на стадии 3.2, определяли путем посева соответствующих разведений на чашки с агаром YPD. Затем в каждую из 48 15-миллилитровых культуральных пробирок, содержащих 3 мл жидкой среды YPD, инокулировали примерно 100 клеток из библиотечного пула G01. Культуральные пробирки инкубировали в течение трех дней на роторном ин-

кубаторе при 30°C, в результате чего получали 48 подпулов с сотнями колоний из библиотеки G01, представляющих примерно 4800 отдельных клонов из библиотечного пула G01.

Стадия 4.2. Выделение геномной ДНК дрожжей из подпулов FS0105 с сотнями колоний.

Геномную ДНК выделяли из каждого из 48 подпулов с сотнями колоний (см. предыдущую стадию) в соответствии со стадией 3.1, и конечную концентрацию снова доводили до приблизительно 5 нг гДНК/мкл.

Стадия 4.3. Анализ образцов гДНК подпулов с сотнями колоний методом ddPCR.

гДНК, полученную из 48 подпулов с сотнями колоний, каждый из которых содержал примерно 100 колоний из пула G01, анализировали так, как описано выше (см. стадию 3.2). Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft версии v1.7 (Bio-Rad). Пороговое значение определяли с помощью двумерного графика и задавали его на уровне 2000 в случае амплитуды канала 1 и 2500 в случае амплитуды канала 2. В микротитровальном планшете были выявлены четыре отдельные лунки (G07, C08, C09, G10), для которых наблюдали относительное содержание выше 1%, что указывало на присутствие по меньшей мере 1 мутантной колонии в конкретном пуле из 100 колоний.

Стадия 4.4. Создание подпулов с десятками колоний из общей случайной библиотеки FS0105.

У подпула C09 с сотнями колоний наблюдали наибольшее относительное содержание в ddPCR-анализах (2,99%), и он был выбран для дополнительных анализов.

Аналогично стадии 4.1 титр клеток положительного подпула C09 с сотнями колоний, выявленного на стадии 3.2, определяли путем посева соответствующих разведений на чашки с агаром YPD. Затем в каждую из 24 15-миллилитровых культуральных пробирок, содержащих 3 мл жидкой среды YPD, инокулировали примерно 10 клеток из пула C09 с сотнями колоний. Культуральные пробирки инкубировали в течение трех дней на роторном инкубаторе при 30°C, в результате чего получали 24 подпулов с сотнями колоний из библиотеки C09, представляющих примерно 240 отдельных клонов из пула G01 с сотнями колоний.

Стадия 4.5. Выделение геномной ДНК дрожжей из подпулов FS0105 с сотнями колоний.

Геномную ДНК выделяли из каждого из 24 подпулов с десятками колоний (см. стадию 4.4) в соответствии со стадией 3.1, и конечную концентрацию снова доводили до приблизительно 5 нг гДНК/мкл.

Стадия 4.6. Анализ образцов гДНК подпулов с десятками колоний методом ddPCR.

гДНК, полученную из 24 отдельных подпулов с десятками колоний, анализировали так, как описано выше. Данные анализировали так, как описано выше (см. стадию 3.2), с применением программного обеспечения QuantaSoft (версия v1.7, Bio-Rad). Пороговое значение определяли с помощью двумерного графика и задавали его на уровне 1500 в случае амплитуды канала 1 и 2000 в случае амплитуды канала 2. У трех отдельных пулов (A02, C03 и D03) наблюдали относительное содержание выше 10%, что подтверждало наличие по крайней мере одной мутантной колонии в каждом из трех пулов из 10 колоний.

Стадия 4.7. Выявление отдельных клонов из подпулов FS0105 с десятками колоний, несущих введенную представляющую интерес мутацию.

Подпул D03 с десятками колоний, у которого наблюдали наибольшее относительное содержание в ddPCR-анализе (стадия 4.6), был выбран для дополнительного анализа. гДНК выделяли из 16 отдельных дрожжевых колоний, полученных из подпула D03 с десятками колоний, и подвергали такому же анализу, как описано выше (см. стадии 4.3 и 4.6). Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft версии v1.7 (Bio-Rad). Пороговое значение определяли с помощью двумерного графика и задавали его на уровне 2000 в случае амплитуды канала 1 и 2500 в случае амплитуды канала 2. У двух отдельных пулов (C02 и D02) наблюдали относительное содержание выше 99,9%, что подтверждало наличие двух мутантных дрожжевых колоний среди 16 протестированных отдельных колоний.

Стадия 4.8. Выделение мутантной дрожжевой чистой культуры.

У штамма FS0105 наблюдали тенденцию к образованию более крупных клеточных агрегатов. Для того чтобы гарантировать, что будущая исходная культура представляющих интерес мутантных дрожжей была получена из одной клетки, а не агломерации клеток, применяли препаравальный микроскоп Singer MSM 400 Dissecting Microscope для выделения отдельных клеток из двух отдельных пулов C02 и D02. В этом отношении клеточные суспензии из отдельных пулов разводили в 1000 раз ТЕ-буфером, который поддерживает высвобождение определенных скоплений клеток, и 10 мкл разведенной суспензии наносили на агаровую пластинку сложной среды. Отдельные клетки затем выделяли в соответствии с рекомендациями/руководством производителя.

Стадия 4.9. Подтверждение выбранной представляющей интерес мутации с помощью анализов последовательности ДНК.

Геномную ДНК из одноклеточных изолятов, полученных на стадии 4.8, выделяли с помощью стандартного протокола получения геномной ДНК дрожжей, а участок, покрывающий целевой ген ScFDC1, амплифицировали с помощью стандартных методик ПЦР с применением ScFDC1-специфических олигонуклеотидов. Полученные фрагменты ДНК очищали с помощью системы Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) и секвенировали (LGC Genomics) по зоне вокруг представляющего интерес нуклеотида (+476 из ScFDC1). Из результатов анализа выделенных последовательностей ДНК было видно, что оба клона из отдельных клеток, взятых из отдельных пулов C02 и D03 (см. 4.7 и 4.8), содержали



требуемую нонсенс-мутацию W159\*, вызванную G-A переходом в нуклеотиде +476 гена ScFDC1.

Пример 22.

Растение пшеницы, несущее конкретную мутацию, выявляли с помощью способов, описанных в приведенных выше последовательностях действий и примерах. Наименование различных пулов и т.д. давали с использованием наименований, показанных на фиг. 2. Тогда как ячмень является самоопыляющимся диплоидным видом с 14 хромосомами, у пшеницы распространена полиплоидия. В настоящем примере продемонстрировано, что способы по настоящему изобретению можно применять даже с полиплоидным организмом, таким как пшеница. Как описано, способы можно применять для выявления любого мутанта. В настоящем примере описано выявление конкретной мутации (гуанин-аденин), приводящей к замене аминокислоты триптофан на кодон остановки трансляции в гене пшеницы GASR7 на А-геноме (TaGASR7-A1) в положении 91. Последовательность гена GASR7-A1 доступна в GenBank под номером NCBI: KJ000052, последовательность кДНК представлена в настоящем документе под SEQ ID NO: 25, а аминокислотная последовательность GASR7 представлена под SEQ ID NO: 8.

ddPCR-анализ.

Был разработан специфический ddPCR-анализ, который позволяет специфически различать мутантный аллель и аллель дикого типа TaGASR7-A1 в нуклеотидном положении 273 в кодирующей последовательности дикого типа (номер GenBank, NCBI: KJ000052). Зонд для детекции мутантной последовательности был комплементарен кодирующей последовательности, содержащей аденин в нуклеотидном положении 273. Зонд для детекции эталонной последовательности был комплементарен кодирующей последовательности, содержащей гуанин в нуклеотидном положении 273. Были разработаны два фланкирующих праймера для амплификации геномной последовательности, окружающей нуклеотид 273 в кодирующей последовательности. Для конкретного локуса TaGASR7-A1 в нуклеотидном положении 273 в кодирующей последовательности дикого типа (номер GenBank были разработаны следующие праймеры и зонды:

мишень-специфический прямой праймер (5'-CGCCTGCCCTGCTA-3') (SEQ ID NO: 9);

мишень-специфический обратный праймер (5'-AGAAGAAGAAGAAGAAGAAACCAAGAA-3') (SEQ ID NO: 10);

зонд для детекции мутантной последовательности (5'-CAACAAGTGAAGACCA-3') (SEQ ID NO: 11) - меченный 6-карбоксифлуоресцеином - FAM;

зонд для детекции эталонной последовательности (5'-CAACAAGTGAAGACCA-3') (SEQ ID NO: 12) - меченный флуорофором VIC.

Пул подвергнутых случайному мутагенезу зерен пшеницы получали путем замачивания зерен в 0,6% EMS в течение 17 ч. После этого зерна промывали водой и сушили на фильтровальной бумаге в течение 45 мин. Подвергнутые мутагенезу зерна высевали сразу после сушки.

WS3: определение, содержит ли выборка библиотеки мутантные зерна.

Затем определяли, содержала ли библиотека мутантные зерна, фактически как описано для WS3 и в приведенном выше в настоящем документе примере 7, со следующими особенностями.

Скрининг проводили всего на 94 GLP (94 подпулах), представляющих примерно 30000 мутантных растений пшеницы. ddPCR проводили фактически так, как описано в примере 7.

Один образец гДНК объемом 5 мкл, полученный из гДНК (GT№10001-GT№10094), вносили в каждую лунку, содержащую 17 мкл реакционной смеси для ПЦР и тщательно перемешивали путем пипетирования вверх и вниз.

Планшет для ПЦР загружали в ридер QX200 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories) для анализа капель. Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft (версии v1.7, Bio-Rad Laboratories). Пороговое значение определяли с помощью двумерного графика и задавали его на уровне 3000 в случае амплитуды канала 1 и 2000 в случае амплитуды канала 2. По результатам сравнения индивидуальных значений для относительного содержания было видно, что гДНК (GT№10072) содержала больший сигнал, полученный в результате обнаружения мутантной последовательности, чем в любом другом образце. Относительное содержание гДНК (GT№10072) составляло 0,130% в сравнении с 0,024%, которое представляло собой среднее относительное содержание для всех 94 протестированных образцов гДНК.

WS4: Поиск отдельного(ых) зерна(ен), характеризующего(их)ся представляющей интерес мутацией.

Отдельные зерна пшеницы, несущие мутацию, выявляли фактически так же, как описано выше в настоящем документе в WS4, со следующими особенностями.

Исходя из результатов анализа гДНК из под пулов (GT№10001-GT№10094) с помощью TaGASR7-A1 специфического ddPCR-анализа считали, что весьма вероятно, что 4500 зерен GLP№10072 (соответствующей гДНК положительной выборки (GT№10072)) будут содержать одно или несколько зерен с идентичной представляющей интерес мутацией.

FGLP№10072 создавали путем последовательного забора 96 выборок в каждом случае из 10 зерен из GLP№10072. Каждую аликвоту с 10 зернами помещали на лист бумаги для взвешивания, а затем последовательно фиксировали парой щипцов, при этом использовали гравировальный станок (Marathon-3,

Saeyang Microtech), оснащенный 1,6-миллиметровым сверлом, для просверливания небольшого, 2-3 мм глубиной, отверстия в эндосперме. С помощью вращательного движения перемещали муку из эндосперма на верхнюю часть зерна и окружающую бумагу для взвешивания. Выборки из 10 просверленных зерен помещали в отдельные лунки объемом 2 мл микротитровального планшета, получая вторичный подпул просверленных зерен пшеницы PDGLP№10072. 96 образцов муки, каждый из которых представлял собой муку, полученную от 10 просверленных зерен пшеницы, переносили в отдельные лунки 1,5-миллилитрового микротитровального планшета (PFGLP№10072), сохраняя систему нумерации образцов так, чтобы она совпадала с системой у просверленных зерен.

PFGLP№10072 подвергали экстракции гДНК с помощью полуавтоматической процедуры экстракции ДНК, которая подробно описана в инструкциях к набору NucleoSpin 96 Plant II (Macherey-Nagel). Соответственно каждая лунка микротитровального планшета содержала гДНК из муки 10 зерен.

ДНК, полученную из PFGLP№10072, анализировали так, как описано выше. Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft (версии v1.7, Bio-Rad Laboratories). Пороговое значение определяли с помощью двумерного графика и задавали его на уровне 2500 в случае амплитуды канала 1 и 1700 в случае амплитуды канала 2. В микротитровальном планшете были выявлены две отдельные лунки (B10 и G05), в которых наблюдали относительное содержание 7,6 и 5,2%, что во всех случаях свидетельствовало о наличии двух отдельных мутантов в 2 независимых лунках PDGLP№10072.

Все 10 зерен из лунок B10 PDGLP№10072 проращивали. Собирали листовой материал от всех 10 проростков и подвергали его экстракции ДНК с помощью REDEExtract (Sigma Aldrich). гДНК, полученную из образцов листьев, анализировали так, как описано выше. Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft (версии v1.7, Bio-Rad Laboratories). Пороговое значение определяли с помощью двумерного графика и задавали его на уровне 2000 в случае амплитуды канала 1 и 1600 в случае амплитуды канала 2. У одного проростка, полученного из лунки C03 PDGLP№10072, наблюдали относительное содержание 99%, что подтверждало наличие гомозиготного мутанта.

Дополнительную проверку признака проводили с помощью прямого секвенирования выявленного мутанта и эталонного образца. ДНК экстрагировали из листового материала с помощью процедуры экстракции ДНК REDEExtract (Sigma Aldrich). Для секвенирования готовили 50 мкл реакционной смеси для ПЦР, которая содержала 1 мкл очищенной гДНК 20 мкл REDEExtract (Sigma Aldrich), 500 нМ мишень-специфического прямого праймера, 500 нМ мишень-специфического обратного праймера и воду. Образцы подвергали термоциклированию с использованием следующих условий ПНР: денатурация при 94°C в течение 2 мин, 38 циклов ПНР при 94°C в течение 45 с, 58°C в течение 45 с и 72°C в течение 45 с и завершающее удлинение цепи при 72°C в течение 5 мин перед размещением планшета для ПНР на хранение при 8°C. Отдельные ПНР-продукты очищали с помощью набора для очистки NucleoSpin Gel and PCR. Все образцы секвенировали с применением мишень-специфического прямого праймера и мишень-специфического обратного праймера.

Также было показано, что проросток, который был положительным по мутации в ddPCR-анализе, был гетерозиготным по отношению к мутантному генотипу в заданном геномном местоположении. У эталонного образца наблюдали гомозиготный генотип дикого типа в том же местоположении.

#### Пример 23.

Растение ячменя, несущее конкретную мутацию, выявляли путем комбинированного применения двух методик, одна из которых была предоставлена компанией RainDance Technologies, а другая - компанией Bio-Rad Laboratories. В общих чертах технологию RainDance использовали для выявления конкретных, но сложных образцов, которые содержат гДНК-матрицы из многочисленных мутантных зерен, в то время как последующие BioRad-анализы помогали выявлять отдельные зерна, характеризующиеся представляющей интерес мутацией. Наименование различных пулов и т.д. давали с использованием наименований, показанных на фиг. 2.

Как описано, способы можно применять для выявления любого мутанта. В настоящем примере описано выявление конкретной мутации (гуанин-аденин), приводящей к замене аминокислоты триптофан на кодон остановки трансляции в гене ячменя, кодирующем предполагаемую VAND-ацилтрансферазу (HvBADH1) в положении 31.

#### ddPCR-анализ.

Был разработан специфический ddPCR-анализ, который позволяет специфически различать мутантный аллель и аллель дикого типа HvBADH1 в нуклеотидном положении 93. Кодировочная последовательность дикого типа (последовательность кДНК) представлена в настоящем документе под SEQ ID NO: 17, а мутантная кодирующая последовательность представлена в настоящем документе под SEQ ID NO: 18. Аминокислотная последовательность HvBADH1 представлена под SEQ ID NO: 19. Зонд для детекции мутантной последовательности был комплементарен части кодирующей последовательности, содержащей аденин в нуклеотидном положении 93 в SEQ ID NO: 17. Зонд для детекции эталонной последовательности был комплементарен части кодирующей последовательности, содержащей гуанин в нуклеотидном положении 93. Были разработаны два фланкирующих праймера для амплификации геномной последовательности, окружающей нуклеотид 93 в кодирующей последовательности. Кроме того,

был разработан блокирующий зонд с применением нуклеотидной последовательности зонда для детекции эталонной последовательности, дополненной 3'-спейсером, который предотвращает удлинение цепи эталонной последовательности ДНК-полимеразами во время ПЦР. Для конкретного локуса HvBADH1 были разработаны следующие праймеры и зонды:

мишень-специфический прямой праймер (5'-CCCGACCACACGC-3') (SEQ ID NO: 20);

мишень-специфический обратный праймер (5'-ACTCCACCAGGCCG-3') (SEQ ID NO: 21);

зонд для детекции мутантной последовательности (5'-CTGGCGTGAGTGGAC-3') (SEQ ID NO: 22) - меченный 6-карбоксифлуоресцеином - FAM;

зонд для детекции эталонной последовательности (5'-CTGGCGTGGGTGGA-3') (SEQ ID NO: 23) - меченный тетрахлорфлуоресцеином - TET;

блокирующий зонд (5'-CTGGCGTGGGTGGA-3') (SEQ ID NO: 24) - меченный 2',3'-дидезокси-спейсером.

Получение "суперпулов" гДНК.

Вкратце 50 мкл каждого экстракта гДНК из всех 94 "аликвот из отдельных "всего муки из подвыборки" (ASFT)", представленных на одном 96-луночном планшете, объединяли в один "суперпул".

Определение, содержит ли "суперпул" мутантные зерна.

Затем определяли, содержал ли суперпул, содержащий ДНК от 94 ASFT, мутантные зерна, фактически как описано в приведенном выше в настоящем документе примере 17 со следующими особенностями.

Во-первых, 2 мкл гДНК из суперпула добавляли к 50 мкл смеси для обогащающей и блокирующей ПЦР, содержащей 10 мкл 5× реакционного буфера Q5 (New England Biolabs), 200 мкМ dNTP, 0,02 ед./мкл высокоточной ДНК-полимеразы Q5, 100 нМ мишень-специфического прямого ПЦР-праймера, 100 нМ мишень-специфического обратного ПЦР-праймера, 100 нМ блокирующего зонда (2',3'-дидезокси-спейсера) и воды. Смесь для ПЦР подвергали термоциклированию с использованием стандартных условий ПЦР: денатурирование при 98°C в течение 2 мин, 20 циклов ПЦР при 98°C в течение 10 с, 57°C в течение 20 с и 72°C в течение 10 с и завершающее удлинение цепи при 72°C в течение 5 мин перед размещением на хранение при 8°C.

Во-вторых, с помощью устройства RainDrop Source создавали капли для 4 индивидуально обогащенных и заблокированных "суперпулов". Аликвоту объемом 10 мкл обогащенного и заблокированного продукта ПЦР из каждого "суперпула" индивидуально объединяли с 25 мкл супермикса для зондов (Bio-Rad); стабилизатором капель (RainDance); 900 нМ мишень-специфического прямого праймера; 900 нМ мишень-специфического обратного праймера; 120 нМ зонда для детекции эталонной последовательности (TET); 440 нМ зонда для детекции мутантной последовательности (FAM) и H<sub>2</sub>O для доведения до общего объема реакционной смеси 50 мкл. В общей сложности 4 отдельных реакционных смеси, представляющих собой 4 отдельных "суперпула" гДНК, вносили в чип Source (RainDance) и обрабатывали на устройстве Source Instrument (RainDance).

8-луночный стрип для ПЦР, содержащий капли, образованные из реакционных смесей с помощью устройства Source Instrument (RainDance), описанного в настоящем документе ранее, герметично закрывали и подвергали термоциклированию с использованием стандартных условий ПЦР: денатурирование при 95°C в течение 10 мин, 40 циклов ПЦР при 95°C в течение 15 с, 55°C в течение 1 мин и завершающее удлинение цепи при 98°C в течение 10 мин перед размещением на хранение при 8°C. После этого амплифицированные смеси переносили в устройство Sense Instrument (RainDance) и анализировали с использованием программного обеспечения для анализа данных RainDrop Analyst.

Среднее относительное содержание 4 суперпулов составляло 0,0115%. Суперпул SP-гДНК№05 имел относительное содержание 0,0228%, что указывало на высокую вероятность того, что этот суперпул содержит ДНК из мутантных зерен.

Определение, содержит ли выборка библиотеки мутантных зерен.

Затем определяли, содержал ли планшет из 94 ASFT, которые соответствовали SP-гДНК№05, мутантные зерна, фактически как описано в приведенном выше в настоящем документе примере 7, со следующими особенностями.

Скрининг проводили всего на 94 SGT (94 всего зерен в подвыборке), представляющими примерно 30,000 мутантных растений пшеницы. Для этой части скрининга применяли гДНК, которая была очищена из ASFT, т.е. ДНК, которая не была обогащена. Для аналитических целей 5 мкл очищенной гДНК, полученной из гДНК (GT№377-GT№470), добавляли к 17-микролитровой ПЦР-смеси, содержащей 11 мкл 2× ddPCR Supermix для зондов (№ dUTP; Bio-Rad Laboratories), 900 нМ мишень-специфических ПЦР-праймеров, 250 нМ зонда для детекции мутантной последовательности (6-карбоксифлуоресцеин - FAM) и зонда для детекции последовательности дикого типа (тетрахлорфлуоресцеин - TET). Реакционную смесь загружали в устройство для создания капель AutoDG Droplet Generator (Bio-Rad) и проводили процедуру создания капель в соответствии с руководством производителя. Капельную эмульсию подвергали термоциклированию с использованием стандартных условий ПЦР: денатурация при 95°C в течение 10 мин, 40 циклов ПЦР при 94°C в течение 30 с и 55°C в течение 1 мин и завершающее удлинение цепи

при 98°C в течение 10 мин перед размещением микротитровального планшета на хранение при 8°C. ПЦР-амплификацию в каплях подтверждали с помощью капельного ридера QX200 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories). Планшет для ПЦР загружали в ридер QX200 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories) для анализа капель. Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft (версии v1.7, Bio-Rad Laboratories). Пороговое значение определяли с помощью двумерного графика и задавали его на уровне 2200 в случае амплитуды канала 1 и 2700 в случае амплитуды канала 2. По результатам сравнения индивидуальных значений для относительного содержания было видно, что гДНК (GT№416) содержала больше сигнала, полученного в результате обнаружения мутантной последовательности, чем в любом другом образце. Относительное содержание гДНК (GT№416) составляло 0,4% в сравнении с 0,073%, которое представляло собой среднее относительное содержание для всех 94 протестированных образцов гДНК.

Поиск отдельного(ых) зерна(ен), характеризующего(их)ся представляющей интерес мутацией.

Отдельные зерна ячменя, несущие мутацию, выявляли фактически так же, как описано выше в настоящем документе в примерах 9-15, со следующими особенностями.

Исходя из результатов анализа гДНК (GT№416) с помощью HvBADH1 специфического ddPCR-анализа считали, что весьма вероятно, что 4500 зерен GLP№416 (соответствующей гДНК положительной выборки (GT№416)) будут содержать одно или несколько зерен с идентичной представляющей интерес мутацией.

FGLP№416 создавали путем последовательного забора 96 выборок в каждом случае из 12 зерен из GLP№416. Каждую аликвоту с 12 зернами помещали на лист бумаги для взвешивания, а затем последовательно фиксировали парой щипцов, при этом использовали гравировальный станок (Marathon-3, Saeyang Microtech), оснащенный 1,6-миллиметровым сверлом, для просверливания небольшого, 2-3 мм глубиной, отверстия в эндосперме. С помощью вращательного движения перемещали муку из эндосперма на верхнюю часть зерна и окружающую бумагу для взвешивания. Выборки из 10 просверленных зерен помещали в отдельные лунки объемом 2 мл микротитровального планшета, получая вторичный подпул просверленных зерен ячменя PDGLP№416. 96 Образцов муки, каждый из которых представлял собой муку, полученную от 12 просверленных зерен ячменя, переносили в отдельные лунки 1,5-миллилитрового микротитровального планшета (PFGLP№416), сохраняя систему нумерации образцов так, чтобы она совпадала с системой у просверленных зерен.

PFGLP№416 подвергали экстракции гДНК с помощью полуавтоматической процедуры экстракции ДНК, которая подробно описана в инструкциях к набору NucleoSpin 96 Plant II (Macherey-Nagel). Соответственно каждая лунка микротитровального планшета содержала гДНК из муки 12 зерен.

ДНК, полученную из PFGLP№416, анализировали с использованием той же смеси для ПНР и тех же условий реакции ПЦР, которые описаны выше (определение, содержит ли выборка библиотеки мутантные зерна). Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft (версии v1.7, Bio-Rad Laboratories). Пороговое значение определяли с помощью двумерного графика и задавали его на уровне 3000 в случае амплитуды канала 1 и 2500 в случае амплитуды канала 2. В микротитровальном планшете были выявлены две отдельные лунки (D10 и F02), в которых наблюдали относительное содержание 3,4 и 13,7%, что свидетельствовало о наличии двух отдельных мутантов в 2 независимых лунках PDGLP№416.

Все 12 зерен из лунок F02 PDGLP№416 проращивали. Собирали листовой материал от всех 12 проростков и подвергали его экстракции ДНК с помощью REDExtract (Sigma Aldrich). гДНК, полученную из образцов листьев, анализировали с использованием той же смеси для ПЦР и тех же условий реакции ПЦР, которые описаны выше (определение, содержит ли выборка библиотеки мутантные зерна). Данные анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft (версии v1.7, Bio-Rad Laboratories). Пороговое значение определяли с помощью двумерного графика и задавали его на уровне 5000 в случае амплитуды канала 1 и 3200 в случае амплитуды канала 2. У одного проростка, полученного из лунки F02 PDGLP№416, наблюдали относительное содержание 39%, что подтверждало наличие гетерозиготного мутанта.

#### **Перечень литературы**

- Andrew J. Goodall, Pankaj Kumar and Alyson K. Tobin (2013). Identification and expression analyses of cytosolic glutamine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Physiol.* 54: 492-505.
- Botticella, E., Sestili, F., Hernandez-Lopez, A., Phillips, A., & Lafiandra, D. (2011). High resolution melting analysis for the detection of EMS induced mutations in wheat *SbeIIa* genes. *BMC Plant Biology* 11: 156.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

Jiang, F. et al. (2016). Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science* 351: 867-871.

Pleasant, et al. (2010). A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 463: 191-196.

Schuster-Böckler, B. and Lehner, B. (2012). Chromatin organization is a major influence on regional mutation rates in human cancer cells. *Nature* 488: 504-507.

Yamaya, T. and Kusano, M. (2014). Evidence supporting distinct functions of three cytosolic glutamine synthetases and two NADH-glutamate synthases in rice. *J. Exp. Bot.* 65: 5519-5525.

Wellner, V. P. and Meister, A. (1966). Binding of Adenosine Triphosphate and Adenosine Diphosphate by Glutamine Synthetase. *Biochemistry* 5: 872-879.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выявления подпула, содержащего организм предопределенного вида, несущего одну или несколько заданных мутаций в представляющем(их) интерес нуклеотиде(ах) [NOI] в целевой последовательности, причем заданная мутация представляет собой делецию или замену одного или более NOI, причем указанный способ предусматривает следующие стадии:

а) получение пула организмов указанного вида или их репродуктивных частей, представляющих множество генотипов;

б) разделение указанного пула на один или несколько подпулов организмов или их репродуктивных частей таким образом, что большинство организмов их репродуктивных частей одного и того же генотипа содержатся в одном и том же подпуле;

с) получение образцов гДНК, каждый из которых содержит геномную ДНК (гДНК) от каждого генотипа в подпуле, при этом сохраняя потенциал для размножения организмов каждого генотипа в указанном подпуле;

д) проведение множества ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает образец гДНК из одного подпула, причем каждая ПЦР-амплификация включает множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает часть указанного образца гДНК, один или несколько наборов праймеров, при этом каждый набор фланкирует целевую последовательность, и реагенты для ПЦР, тем самым амплифицируя целевую(ые) последовательность(и);

е) детектирование продукта(ов) ПЦР-амплификаций, содержащего(их) одну или несколько целевых последовательностей, содержащих мутацию(и) по NOI, тем самым выявляя подпул(ы), содержащий(ие) указанную(ые) мутацию(и).

2. Способ по п.1, дополнительно предусматривающий следующие стадии:

ф) разделение организмов или их репродуктивных частей указанного(ых) выявленного(ых) подпула(ов) на вторичные подпулы;

г) получение образцов гДНК, каждый из которых содержит гДНК от каждого генотипа во вторичном подпуле, при этом сохраняя потенциал для размножения организмов каждого генотипа в указанном вторичном подпуле;

h) проведение множества ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает образец гДНК из одного вторичного подпула, один или несколько наборов праймеров, при этом каждый набор фланкирует целевую последовательность, и реагенты для ПЦР, тем самым амплифицируя целевую(ые) последовательность(и);

и) детектирование продуктов ПЦР-амплификации, включающих одну или несколько целевых последовательностей, содержащих заданную(ые) мутацию(и) по NOI, тем самым выявляя вторичные подпулы из стадии i), содержащие указанную(ые) мутацию(и);

j) выявление организма или его репродуктивной части в указанном вторичном подпуле, который/которая несет указанную(ые) мутацию(и).

3. Способ по любому из пп.1 или 2, предусматривающий, что каждый подпул содержит по меньшей мере 100 организмов или их репродуктивных частей, представляющих различные генотипы.

4. Способ по п.2, предусматривающий разделение организмов или их репродуктивных частей указанных выявленного(ых) подпула(ов) по меньшей мере на 90 вторичных подпулов на стадии f).

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, предусматривающий, что ПЦР-амплификацию(и) на стадии d) проводят способом, предусматривающим следующие стадии:

получение одной или нескольких смесей для ПЦР-амплификации, содержащих образец гДНК, один или несколько наборов праймеров, причем каждый набор фланкирует целевую последовательность, и реагенты для ПЦР;

разделение указанной смеси для ПЦР-амплификации на множество пространственно разделенных компартментов;

проведение ПЦР-амплификации(й);

детектирование продуктов ПЦР-амплификации.

6. Способ по п.5, предусматривающий, что указанные пространственно разделенные компартменты представляют собой капли, такие как капли эмульсии по типу "вода в масле", причем каждая капля имеет средний объем в диапазоне 0,1-10 нл.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, предусматривающий, что каждая ПЦР компартиментализирована в диапазоне 1000-100000 пространственно разделенных компартментов.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, предусматривающий, что реагенты для ПЦР содержат

а) один или несколько зондов для детекции мутации, причем каждый зонд для детекции мутации представляет собой олигонуклеотид, функционально связанный с детектируемым средством, причем олигонуклеотид идентичен или комплементарен целевой последовательности, включающей заданную мутацию по NOI; и/или

б) один или несколько зондов для детекции эталонной последовательности, причем каждый зонд для детекции эталонной последовательности представляет собой олигонуклеотид, функционально связанный с детектируемым средством, причем олигонуклеотид идентичен или комплементарен целевой последовательности, включающей эталонную последовательность NOI;

при этом необязательно зонд(ы) для детекции мутантной последовательности связан(ы) с флуорофором и гасителем флуоресценции, а зонд для детекции эталонной последовательности связан с другими флуорофором и гасителем флуоресценции; необязательно реагенты для ПЦР содержат по меньшей мере 2-кратный избыток зонда(ов) для детекции мутантной последовательности в сравнении с зондом(ами) для детекции эталонной последовательности.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, предусматривающий, что указанный пул организмов получают, подвергая организмы указанного вида или их репродуктивные части случайному мутагенезу.

10. Способы по любому из предыдущих пунктов, предусматривающие, что пул организмов содержит по меньшей мере 10000 организмов или их репродуктивных частей с различными генотипами.

11. Способы по любому из предыдущих пунктов, предусматривающие, что пул организмов содержит по меньшей мере 100000 организмов или их репродуктивных частей с различными генотипами.

12. Способы по любому из предыдущих пунктов, предусматривающие, что пул организмов содержит по меньшей мере 500000 организмов или их репродуктивных частей с различными генотипами.

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, предусматривающий, что способы предусматривают стадию репродукции организмов или их репродуктивных частей в пул, причем указанную стадию репродукции можно проводить одновременно или последовательно со стадией б) разделения организмов на подпулы.

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, предусматривающий, что вид представляет собой растение, а стадии а) и б) указанного способа включают следующие стадии:

получение множества семян растения, при этом предпочтительно получают по меньшей мере 100000, например по меньшей мере 500000 семян;

случайный мутагенез указанных семян с получением таким образом семян поколения M0;

выращивание указанных семян поколения M0 в зрелые растения и получение семян из указанных зрелых растений, причем указанные семена являются семенами поколения M1;

необязательно повторение предыдущей стадии X раз для получения растений, содержащих семена поколения M(1+X);

получение семян либо поколения M1, либо поколения M(1+X) из указанных зрелых растений с получением, таким образом, пула семян;

разделение указанного пула из различных стадий на подпулы, причем все семена из данного зрелого растения помещают в один и тот же подпул;

и/или стадии f) и g) включают следующие стадии:

получение подпула, содержащего множество семян растения, причем указанный подпул содержит одну или несколько мутаций по NOI;

разделение семян указанного подпула на вторичные подпулы, каждый из которых содержит в диапазоне от 1 до 100 семян;

получение образца от каждого семени из вторичных подпул способом, который оставляет их достаточно интактными для развития в растение, и объединение всех образцов от всех семян из каждого вторичного подпула;

получение образца гДНК из указанных объединенных образцов;

и/или причем стадия j) выявления организма включает следующие стадии:

получение вторичного подпула, включающего организм или его репродуктивные части, содержащего мутацию по NOI;

культивирование всех семян в указанном вторичном подпуле для обеспечения возможности про-

растения и необязательно развития растений из каждого семени;  
 получение образца от каждого проросшего семени;  
 тестирование указанного образца на наличие указанной мутации по NOI с выявлением тем самым растения, несущего мутацию по NOI;

необязательно выращивание указанного растения до зрелости.

15. Способ по п.14, предусматривающий, что указанный образец получают путем просверливания отверстия в семени с последующим сбором полученной муки.

16. Способ по любому из пп.1-10, предусматривающий, что вид представляет собой одноклеточный организм, а стадии а) и б) указанного способа включают следующие стадии:

получение множества одноклеточных организмов;

случайный мутагенез указанных организмов;

разделение подвергнутых мутагенезу организмов на подпулы;

проведение с каждым из подпулов стадии репродукции;

и/или стадия f) включает следующие стадии:

получение подпула, содержащего мутацию(и) по одному или нескольким NOI;

клональное репродуктивное размножение нескольких или всех организмов из указанного подпула с получением клональных культур;

объединение фракции организмов из множества указанных клональных культур с получением вторичных подпулов, причем предпочтительно вторичный подпул содержит фракции в диапазоне 10-100 клональных культур;

и/или причем стадия j) выявления организма включает следующие стадии:

получение вторичного подпула, содержащего мутацию по NOI;

клональное репродуктивное размножение нескольких или всех организмов из указанного подпула;

определение, какой(ие) клон(ы) включает(ют) организмы, содержащие мутацию по NOI.

17. Способ по любому из предыдущих пунктов, предусматривающий, что ПЦР-амплификация на стадии h) включает множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций.

18. Способ по любому из предыдущих пунктов, причем способ дополнительно предусматривает стадию выявления суперпула, содержащего одну или несколько мутаций по NOI, причем суперпул представляет собой группу подпулов.

19. Способ по п.15, причем способ дополнительно предусматривает следующие стадии, проводимые после стадии с):

получение фракции каждого образца гДНК из каждого подпула;

объединение множества фракций в суперпулы, например, с получением от 5 до 100 суперпулов, с получением, таким образом, суперпулов гДНК, содержащих образцы гДНК из множества подпулов, причем гДНК из каждого подпула присутствует только в одном суперпуле;

проведение множества ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает образец гДНК из суперпула, причем каждая ПЦР-амплификация включает множество компартиментализированных ПЦР-амплификаций, каждая из которых включает часть указанного образца гДНК, один или несколько наборов праймеров, при этом каждый набор фланкирует целевую последовательность, и реагенты для ПЦР, тем самым амплифицируя целевую(ые) последовательность(и);

детектирование продукта(ов) ПЦР-амплификаций, содержащего(их) одну или несколько целевых последовательностей, содержащих мутацию(и) по NOI, тем самым выявляя суперпул(ы), содержащий(ие) указанную мутацию;

необязательно способ дополнительно предусматривает стадию обогащения суперпулов гДНК, проводимую до проведения указанной компартиментализированной ПЦР.

20. Способ по п.16, причем стадия обогащения предусматривает проведение ПЦР-амплификаций на суперпуле гДНК, причем каждая смесь для ПЦР-амплификации содержит набор праймеров, фланкирующих целевую последовательность, блокирующий зонд и реагенты для ПЦР, причем блокирующий зонд предназначен для ингибирования амплификации целевой последовательности, содержащей эталонный NOI.

21. Способ по любому из пп.15-17, предусматривающий, что стадию d) проведения ПЦР-амплификаций проводят только на образцах гДНК из подпула(ов), содержащего(их) одну из мутаций.

22. Способ по любому из пп.15-18, предусматривающий, что ПЦР-амплификацию(и), содержащую(ие) суперпул образцов гДНК, проводят согласно способу, предусматривающему следующие стадии:

получение смеси для ПЦР-амплификации, содержащей образец гДНК, один или несколько наборов праймеров, причем каждый набор фланкирует целевую последовательность, и реагенты для ПЦР;

разделение указанной(ых) ПЦР-амплификации(й) на множество пространственно разделенных компартиментов, причем каждый компартимент имеет средний объем в диапазоне от 0,1 до 10 нл;

проведение ПЦР-амплификации;

детектирование продуктов ПЦР-амплификации;

причем необязательно каждая ПЦР компартиментализирована по меньшей мере на 1000000 компар-

тментов, таких как пространственно разделенные компартменты; и/или

причем указанные пространственно разделенные компартменты представляют собой капли, такие как капли эмульсии по типу "вода в масле".

23. Способ по любому из пп.1-10 и 13-19, предусматривающий, что вид представляет собой одноклеточный организм, например дрожжи.

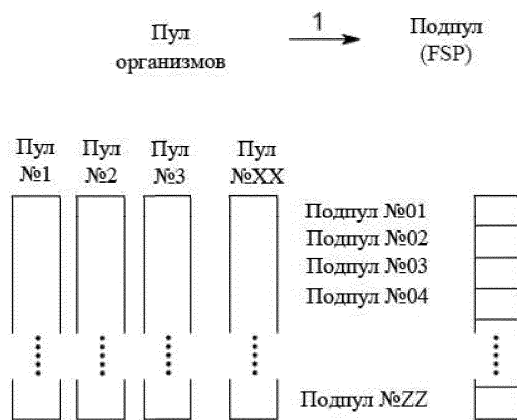
24. Способ по любому из пп.1-12 и 14-19, предусматривающий, что вид представляет собой растение, например цветковое растение.

25. Способ по любому из пп.1-12 и 14-19, предусматривающий, что вид представляет собой злаковое, например ячмень.

26. Способ по любому из предыдущих пунктов, предусматривающий, что мутация представляет собой замену одного нуклеотида.

27. Способ по любому из предыдущих пунктов, причем способ представляет собой способ выявления более чем одной заданной мутации, например реагенты для ПЦР содержат один зонд для детекции мутантной последовательности, специфичный к каждой заданной мутации.

28. Способ по любому из пп.1-23, причем способ представляет собой способ выявления одной заданной мутации в целевой последовательности и способ предусматривает использование лишь одного набора праймеров, фланкирующих указанную целевую последовательность, например реагенты для ПЦР содержат лишь один зонд для детекции мутации.

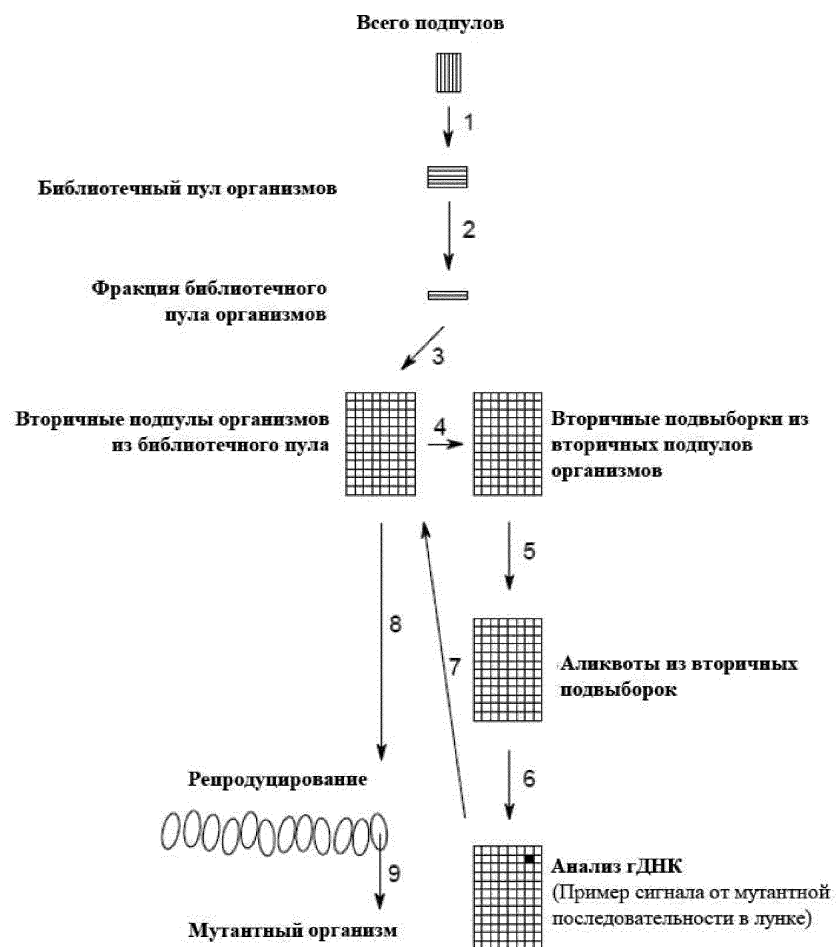


Фиг. 1А

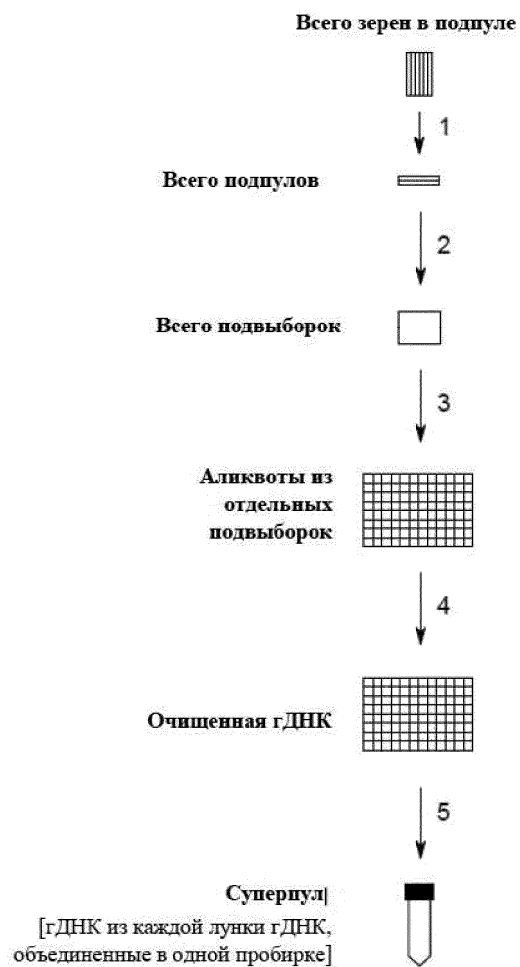




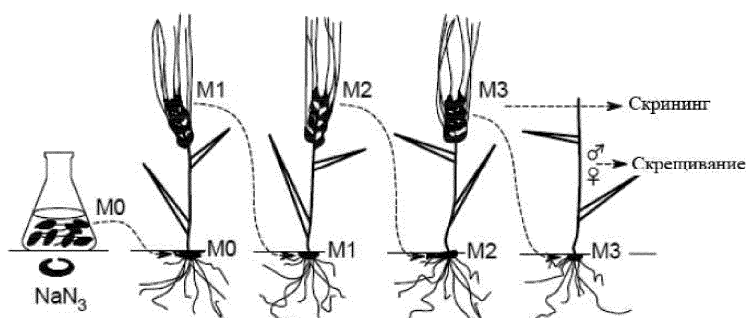
Фиг. 1В



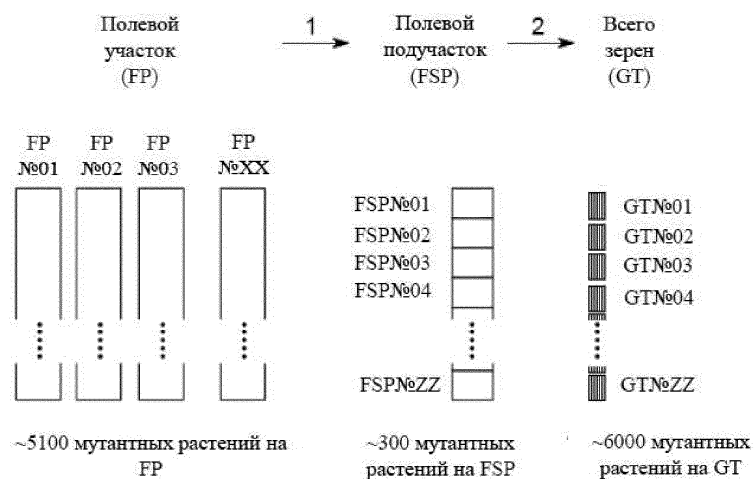
Фиг. 1С



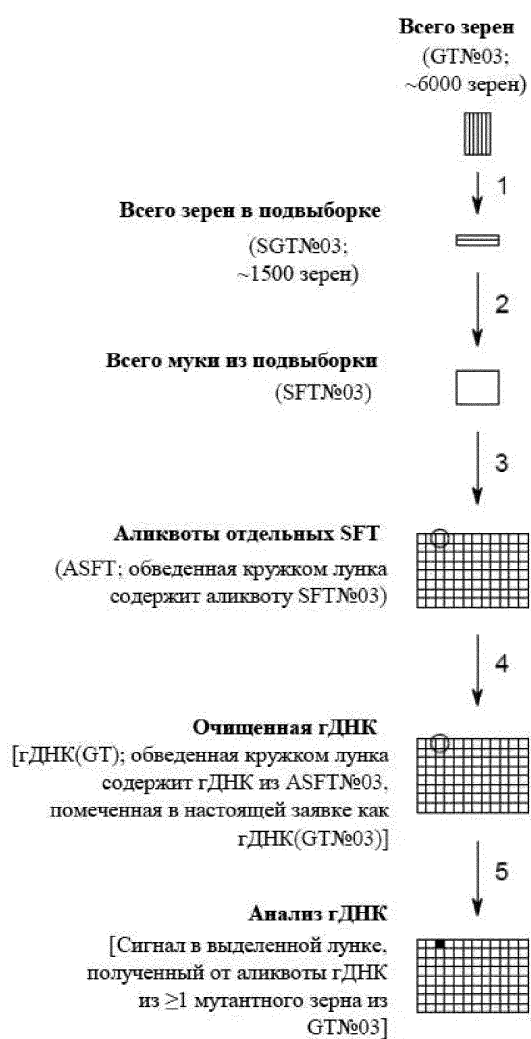
Фиг. 1D



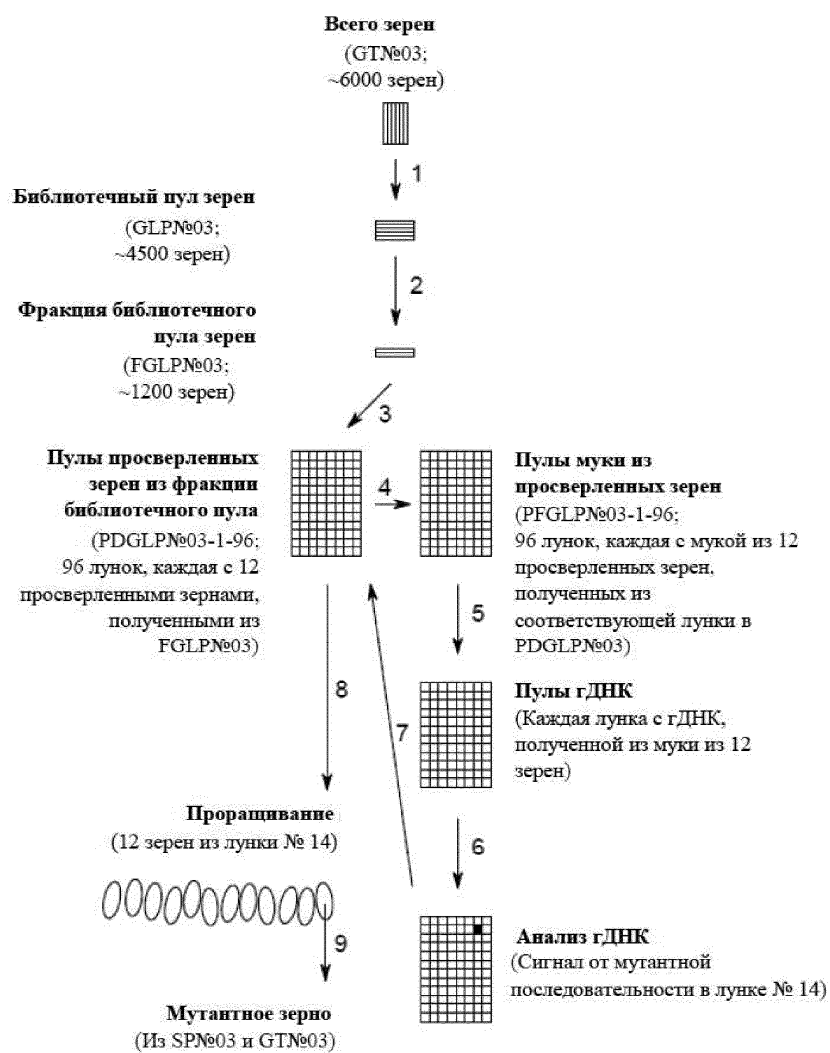
Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 2С



Фиг. 2D



Фиг. 2Е

