

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202092075** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2022.03.31**

(51) Int. Cl. *C12N 15/82* (2006.01)  
*A01H 1/06* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2020.09.09**

---

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/Cas9 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИНИЙ  
КАРТОФЕЛЯ, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО БЕЗАМИЛОЗНЫЙ КРАХМАЛ**

---

(96) **KZ2020/054 (KZ) 2020.09.09**

(72) Изобретатель:

(71) Заявитель:  
**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ  
ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ  
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
БИОТЕХНОЛОГИИ" КОМИТЕТА  
НАУКИ МИНИСТЕРСТВА  
ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН (KZ)**

**Манабаева Шуга Аскаровна, Абеуова  
Лаура Сериккызы, Раманкулов Ерлан  
Мирхайдарович (KZ)**

---

(57) Изобретение относится к области генетической инженерии и биотехнологии растений, а именно к применению технологии CRISPR/Cas для редактирования генома картофеля. Настоящее изобретение может быть использовано для получения растений в прикладных научных исследованиях, в частности создать сельскохозяйственные культуры, улучшенные по качественным и количественным признакам. Технический результат, который может быть достигнут с использованием данного способа, получение линий картофеля, продуцирующего безамилозный крахмал. При решении технической задачи выбран гена-мишень, а также последовательности химерной направляющей РНК; конструированы векторы для экспрессии системы CRISPR/Cas9, содержащие все элементы, необходимые для модифицирования целевых сайтов гена GBSS и функционирования системы CRISPR/Cas9; проведена Agrobacterium-опосредованная трансформация, а также оптимизирован протокол прямой регенерации трансформированных эксплантов; проведен анализ на подтверждение факта экспрессии компонентов системы CRISPR/Cas9 и получения растений-трансформантов, продуцирующих клубни с изменённым составом крахмала; изучены содержания амилозы и амилопектина в картофельном крахмале в клубнях растений-трансформантов. Достижение технического результата позволяет применить технологию CRISPR/Cas для редактирования генома, регулируя экспрессию гена GBSS, и ввести изменение в состав крахмала, в короткие сроки создать линий картофеля с отредактированным геномом на основе отечественных сортов картофеля.

---

**202092075  
A1**

**202092075  
A1**

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### **«ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА КАЗАХСТАНСКИХ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ»**

### **«ҚАЗАҚСТАНДЫҚ КАРТОП ГЕНОМЫН РЕДАКТИРЛЕУ ҮШІН CRISPR/CAS ТЕХНОЛОГИЯСЫН ҚОЛДАНУ»**

Настоящее изобретение относится к области генетической инженерии и биотехнологии растений, а именно, к применению технологии CRISPR/Cas для редактирования генома картофеля. Настоящее изобретение может быть использовано для получения растений в прикладных научных исследованиях, в частности сделать сельскохозяйственные культуры более питательными, более устойчивыми к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды.

CRISPR/Cas (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы регулярно расположенные группами) – мощный инструмент редактирования геномов. В настоящее время данная технология получила бурное развитие [Cong L., Ran F.A., Cox D., Shuailiang L, Barretto R., Habib N., Hsu PD., Wu X., Jiang W., Marraffini LA., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. – 2013. – Vol. 339(6121). – P. 819-823. doi:10.1126/science.1231143. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science. – 2013. – Vol. 339(6121). – P. 823-826. doi 10.1126/science.1232033.], совершенно продвинув сферу редактирования генома благодаря легкости сборки и эффективной

генетической модификации, дав рывок в продвижении генной инженерии. Геномное редактирование оказывает точное и целенаправленное действие, что приводит к резкому снижению временных затрат и созданию сортов с заданными свойствами по сравнению с методами классического мутагенеза, которые опираются на случайные события. Позволяет создавать новые виды растений, улучшая генетические особенности и при этом не затрагивая другие хозяйственно-важные признаки.

Технология CRISPR/Cas основана на использовании природного адаптивного иммунитета у прокариот, который формировался в течение долгой эволюции. Простота программирования системы CRISPR/Cas, уникальный механизм разрезания ДНК, способность к точному узнаванию мишеней, а также существование многих природных вариантов самой системы открывает широкие возможности по улучшению сельскохозяйственных культур, в том числе картофеля, по сравнению с другими технологиями таких как ZFN (Zink-Finger Nucleases) и TALEN (Transcription Activator-Like Effectors). Стратегия геномного редактирования растений включает следующие основные этапы [Kumar V., Jain M. The CRISPR–Cas system for plant genome editing: advances and opportunities // *Journal of Experimental Botany*. – 2015. – Vol. 66 (1). – P. 47–57.]: выбор целевой нуклеотидной последовательности (гена) в геноме; создание нуклеазной конструкции, направленной на выбранную мишень; доставка этой конструкции в клеточное ядро; анализ полученных мутаций; регенерация растений.

Разработка новых сортов картофеля с использованием традиционных скрещиваний являются сложными и медленными из-за тетрасомического наследования и высокой гетерозиготности культивируемых сортов. В связи с народно-хозяйственной ценностью картофеля применение новых методов редактирования генома с целью создания новых улучшенных коммерческих сортов картофеля представляет собой актуальную проблему.

Картофель принадлежит к числу важнейших сельскохозяйственных культур в мировом производстве и занимает ведущее место вслед за рисом, пшеницей и кукурузой. В Казахстане картофель является одним из самых потребляемых продуктов растениеводства и основным сырьем для получения крахмала, который используется в кондитерской, текстильной и пищевой промышленности. Крахмал состоит из двух типов молекул, амилозы и амилопектина. Комбинируя определенные варианты генов, можно запрограммировать растения картофеля на производство крахмала с заданной структурой и свойствами. Гранулы крахмала организованы в виде чередующихся кристаллических и аморфных слоев, образованных двумя типами полимерных молекул – амилозы и амилопектина. В природном картофеле содержание амилозы в крахмале составляет 20-30 %.

Известно, что синтез амилозы в крахмале контролируется геном *GBSS* (*granule bound starch synthase*), кодирующим соответствующий белок закрепленной на грануле крахмалосинтазы, имеющим четыре аллеля в культивируемом картофеле. Работы по получению линий картофеля с измененным содержанием амилозы, ранее проводились либо с помощью традиционной селекции, либо спонтанного мутагенеза [Schwall G.P., Safford R., Westcott R.J., Jeffcoat R., Tayal A., Shi Y.C., Gidley M.J., Jobling S.A. Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. *Nat. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 18(5). – P. 551-554. doi 10.1038/75427. Muth J., Hartje S., Twyman R., Hofferbert HR, Tacke E., Prüfer D. Precision breeding for novel starch variants in potato. *Plant Biotechnology Journal.* – 2008. – Vol. 6. – P. 576–584.], а также благодаря методами генной инженерии, в частности путем подавления функции гена *GBSS* с использованием технологии РНК-интерференция [Kuipers G. J., Jacobsen E., Visser R. Formation and Deposition of Amylose in the Potato Tuber Starch Granule Are Affected by the Reduction of Granule-Bound Starch Synthase Gene Expression. *The Plant Cell.* – 1994. – Vol. 6. – P. 43-52. Andersson M., Melander M., Pojmark P., Larsson H., Bulow L., Hofvander P. Targeted gene suppression by RNA interference. An efficient

method for production of high-amylose potato lines. J. Biotechnol. – 2006. – Vol. 123. – P. 137-148. doi 10.1016/j.jbiotec.2005.11.001.] и также существуют работы генно-модифицированного картофеля официально зарегистрированные в Европе [Ryffel G.U. Making the most of GM potatoes. Nat. Biotechnol. – 2010. – Vol. 28(4). – P. 318. doi 10.1038/nbt0410-318. Wandelt C. Quality traits: Altered starch composition in potato (BASF Plant Science Company GmbH, Meeting on “Genetic basis of unintended effects in modified plants”, 14–15 January 2014, Canada). Ottawa, 2014]. Крахмал из такого картофеля обладает улучшенными гелеобразующими свойствами (скорость образования, прозрачность и вязкость геля) и может быть востребован в пищевой и бумажной промышленности. Относительно недавно был получен картофель, дающий безамилозный крахмал, где нокаут гена *GBSS* с помощью технологии CRISPR/Cas, привел к изменению свойства крахмала за счет сдвига в нем соотношения количества линейных (амилоза) и разветвленных (амилопектин) полисахаридов в пользу последних [Andersson M., Turesson H., Nicolia A., Falt A.-S., Samuelsson M., Hofvander P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. Plant Cell Rep. – 2017. – Vol. 361. – P. 117-128. doi 10.1007/s00299-016-2062-3]. Крахмал с высоким содержанием амилопектина дает гели повышенной оптической прозрачности, устойчивости при центрифугировании, а также демонстрирует повышение максимальной и конечной температуры желатинизации и измененные реологические свойства [Khlestkin V.K., Peltek S.E., Kolchanov N.A. Target genes for development of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars with desired starch properties. Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya. Agricultural Biology. – 2017. – Vol. 52(1). – P. 25-36. doi 10.15389/agrobiology].

В настоящем изобретении нами применена технология CRISPR/Cas для урегулирования экспрессии гена *GBSS*, с помощью которой будет введено изменение в состав крахмала и в короткие сроки созданы растения картофеля с редактированным геномом на основе отечественных сортов картофеля.

Проведенные исследования являются новыми, нам не известны опубликованные работы отечественных учёных по разработке технологии CRISPR/Cas для редактирования генома картофеля казахстанской селекции.

*Аналог изобретения.* Нами не найдено способа применения редактирования генома картофеля отечественных сортов с использованием технологии CRISPR/Cas9. Известны аналогичные работы зарубежных авторов изложенные в виде статей по редактированию генома картофеля с помощью технологии CRISPR/Cas (Andersson M., Turesson H., Olsson N., Fält AS, Ohlsson P., Gonzalez M.N., Samuelsson M., Hofvander P. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiologia Plantarum*. – 2018. – Vol. 164. – P. 378–384.). В данной работе авторы реализовали метод редактирования генома без ДНК, используя доставку рибонуклеопротеинов (RNP), конструируя вектор, содержащий целевой таргет в 9 экзоне гена, кодирующего *GBSS* для модификации картофеля сорта Kuras. В результате авторами были получены более 28% трансформантов, содержащих четыре мутантных аллеля, что могло бы способствовать редактированию генома у полиплоидных растений, таких как картофель.

Из аналогичных изобретений также можно отметить работу Kusano H., Ohnuma M., Mutsuro-Aoki H., Asahi T., Ichinosawa D., Onodera H., Asano K., Noda T., Horie T., Fukumoto K., Kihira M., Teramura H., Yazaki K., Umemoto N., Muranaka T., Shimada H. Establishment of a modified CRISPR/Cas9 system with increased mutagenesis frequency using the translational enhancer dMac3 and multiple guide RNAs in potato. *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8:13753. DOI:10.1038/s41598-018-32049-2, где авторы для усиления экспрессии белка Cas9 применили энхансер трансляции dMac3 с несколькими таргетами нРНК. Авторы исследовали частоту мутантных аллелей в трансгенных растениях картофеля сорта Sayaka. Эффективность целевого мутагенеза по оценке CAPS-анализа достигло примерно 25%.

Несмотря на вышеупомянутые аналоги, процесс регенерации и трансформации растений являются генотип зависимыми, так как

эффективность и возможность получения положительного результата во многом определяются самим генотипом (в данном случае – сортом). Поэтому для достижения эффективности необходимо заново подобрать условия регенерации растений и агробактериальной трансформации для каждого конкретного сорта (генотипа).

*Задача изобретения* – применить технологию CRISPR/Cas для редактирования генома отечественных сортов картофеля.

*Технический результат*, который может быть достигнут с использованием данного способа, получение линий картофеля продуцирующие безамилозный крахмал.

*Достижение технического результата* позволяет применить технологию CRISPR/Cas для редактирования генома регулируя экспрессию гена *GBSS* и ввести изменение в состав крахмала, в короткие сроки создать линий картофеля с отредактированным геномом на основе отечественных сортов картофеля. Отличие предлагаемого нами изобретения от аналогов заключается в выборе целевых таргетов; эффективной двухступенчатой системой клонирования; результативной экспрессии элементов системы CRISPR/Cas; использовании картофеля сортов казахстанской селекции, а также в получении микроклубней картофеля с улучшенным свойством крахмала, который может быть востребован в пищевой (кондитерской), бумажной и текстильной промышленности Республики Казахстан.

Фактически задача решается путем:

1) выбора гена-мишени, а также последовательностей химерной направляющей РНК (далее используется аббревиатура sgRNA), так как важным моментом является тщательный подбор сайтов. При выборе последовательности sgRNA, важно учесть некоторые особенности, связанные с дизайном планируемого эксперимента;

2) конструирования векторов для экспрессии системы CRISPR/Cas9, создания векторов, содержащие все элементы, необходимые для модифицирования целевых сайтов гена *GBSS* и функционирования системы

CRISPR/Cas9, которые будут применяться для редактирования генома картофеля;

3) проведения *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, изучения взаимосвязанных эффектов между концентрацией ацетосирингона, оптической плотности суспензии бактерий и временем ко-культивации для определения оптимальных параметров *Agrobacterium*-опосредованной трансформации эксплантов картофеля;

4) прямой регенераций трансформированных сортов картофеля, оптимизаций протокола прямой регенераций трансформированных эксплантов;

5) подтверждения факта экспрессии компонентов системы CRISPR/Cas9 и получения растений-трансформантов продуцирующие клубни с изменённым составом крахмала;

6) изучения содержания амилозы и амилопектина в картофельном крахмале в клубнях растений-трансформантов.

Первым аспектом изобретения является выбор гена-мишени, а также последовательностей sgRNA. С помощью программного обеспечения будут идентифицированы потенциальные сайты модификации гена *GBSS*, как оптимальные переменные области sgRNA.

Вторым аспектом изобретения является конструирования векторов для экспрессии системы CRISPR/Cas9. Методы конструирования различаются в зависимости от векторов, используемых для экспрессии Cas9 и sgRNA. Последовательность константной области sgRNA остается неизменным, только 20-нуклеотидная целевая последовательность необходимо заменить.

К третьему аспекту изобретения относится агробактериальная трансформация коммерческих сортов картофеля казахстанской селекции. Известно, что *Agrobacterium*-опосредованная трансформация остается трудным и многоэтапным методом. Поэтому проводят работы по оптимизации протокола проведения *Agrobacterium*-опосредованной трансформации.



Четвертый аспект изобретения связан с прямой регенерацией трансформированных эксплантов картофеля трех сортов казахстанской селекции, а именно Аксор, Астаналык и Тохтар. В качестве эксплантов используют стеблевые и листовые сегменты.

Пятый аспект изобретения связан с мониторингом и молекулярным анализом полученных регенерантов. Для этого из полученных трансформантов выделяют геномное ДНК, далее проводят ПЦР мониторинг на наличие компонентов системы CRISPR/Cas9.

Шестой аспект изобретения связан с проведением работ по качественному анализу состава крахмала. Известно, что и амилоза, и амилопектин способны к образованию комплексов с йодом. Поэтому из позитивных растений-регенерантов получают клубни, затем проводят анализ на содержания амилозы в картофельном крахмале.

#### ***Осуществление изобретения.***

#### **Пример 1. Выбор гена-мишени и последовательностей варибельной части направляющей РНК (sgRNA)**

Известно, что структура sgRNA оказывает влияние не только на специфичность, но и на эффективность редактирования. Поэтому важным моментом в работе с технологией CRISPR/Cas9 является тщательный подбор сайтов для специфического внесения двухнитевого разрыва. Дизайн sgRNA должен обеспечить исключение возникновения нецелевых мутаций. Целевые локусы в гене GBSS подбирают с помощью биоинформатических программ.: CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) и CRISPR-P-2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>).

В качестве мишени для редактирования генома картофеля с помощью системы CRISPR/Cas9 выбирает ген, кодирующий гранул связанную синтазу крахмала, который является одним из главных белков, участвующих в биосинтезе крахмала. Сиквенс геномной ДНК изучаемых сортов сравнивают с нуклеотидной последовательностью гена *GBSS* извлеченной из базы данных NCBI (*S.tuberosum* *GBSS* gene, GenBank: A23741.1). Длина

последовательности данного гена составляет 4964 п.н., включая 13 экзонов и 12 интронов. В гене *GBSS* всего в шести экзонах обнаружат участки с тринуклеотидами NGG (PAM), которые служат первым ориентиром для Cas нуклеазы. Участки экзона I выбирают для редактирования гена *GBSS* (рисунок 1) и целевые таргеты отмечают как T1, T2 и T3 (таблица 1).

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов

Праймеры	5' → 3'
GBSS-T1-F	ATTGCCTTGTCACAGATAGGACTC
GBSS-T1-R	AAACGAGTCCTATCTGTGACAAGG
GBSS-T2-F	ATTGGGGCTGTTAACAAGCTTGAT
GBSS-T2-R	AAACATCAAGCTTGTTAACAGCCC
GBSS-T3-F	ATTGТАCTAAGGТАACACCCAAGA
GBSS-T3-R	AAACTCTTGGGTGTTACCTTAGTA

### Пример 2. Конструирование векторов для экспрессии системы CRISPR/Cas9

Фрагменты ДНК, соответствующие таргетам химически синтезируют для сконструирования последовательности sgRNA. Затем проводят гибридизацию пары олигонуклеотидов, после чего двухцепочечные олигонуклеотиды клонируют в промежуточный вектор pEn-Chimera и его производных pMR203, pMR204 и pMR205 между промотором AtU6 и последовательностью константной sgRNA (рисунок 2). В результате получают четыре плазмидных векторов:

pMR287+ AtU6-T1-gRNA

pMR287 + AtU6-T2-gRNA

pMR287+ AtU6-T3-gRNA

pMR287+ AtU6-T1-gRNA+ AtU6-T2-gRNA + AtU6-T3-gRNA

Клонирование последовательности 20 нуклеотидов в sgRNA в векторе pEn-Chimera и его производных обеспечивает специфичность узнавания

протоспейсера в геноме, к которому sgRNA «направляет» комплекс sgRNA - Cas9.

Для редактирования гена GBSS картофеля с помощью CRISPR/Cas технологии сконструируют экспрессионные вектора pMR287 -T1, -T2, -T3 и pMR287-T1+T2+T3 с соответствующими целевыми последовательностями T1, T2 и T3, на основе бинарного экспрессионного вектора pMR287 (pYUCas9Plus), любезно предоставленного профессором Токи (Институт агробиологических наук, Япония). Вектор pMR287 - разработан для экспрессии элементов, необходимых для функционирования системы CRISPR/Cas и содержит следующие элементы: 1) ген cas9 *S. pyogenes* (SpCas9), кодоны которого оптимизированы для экспрессии в клетках растений (SpCas9), 2) селективный маркер для позитивно-негативной селекции, 3) сайт для клонирования sgRNA (рисунок 3). Для клонирования кассеты AtU6-T1-gRNA из промежуточных векторов в экспрессионный вектор pMR287 (pYUCas9Plus) используют технологию Gateway. В основе технологии лежит сайт-специфическая рекомбинация между векторной плазмидой, несущей сайты attL, и фрагментом ДНК (в данном случае кассеты, кодирующие наши таргеты), несущим сайты attR.

Таким образом, создают вектора, содержащие все элементы, необходимые для модифицирования целевых сайтов гена GBSS и функционирования системы CRISPR/Cas, которые применяют для редактирования генома картофеля (рисунок 4).

### Пример 3. *Agrobacterium*-опосредованная трансформация

*Agrobacterium*-опосредованная трансформация является одним из самых эффективных методов переноса генов в растения в связи со стабильностью встраиваемых конструкций и высокой частотой переноса. Эксперименты по трансформации стеблей и листьев картофеля проводят методом инокуляции и ко-культивации эксплантов с суспензией агробактерии. Для повышения доступности *A. tumefaciens*, стебли ранят надрезом размером 1-2 мм, листьев с четырех сторон. Для проведения

экспериментов по агробактериальной трансформации картофеля, используют штамм *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404.

*Agrobacterium*-опосредованную трансформацию проводят в трех повторностях. Через 2 дня ко-культивирования трансформированные экспланты картофеля (листья и стебли) высаживают на питательную среду для регенерации с антибиотиками спектомицин 100 мг/л для селекции и меропенем 50 мг/л для элиминации агробактерий (рисунок 5).

После скрининга колоний *A. tumefaciens* на наличие конструктора, штамм LBA4404 *A. tumefaciens*, несущий бинарную плазмиду используют для трансформации. Ночную культуру агробактерий выращивают в 5 мл жидкой среды LB, дополненной соответствующими селективными антибиотиками - рифампицином и спектиномицином в концентрациях 25 мг/л и 100 мг/л, на шейкере до оптической плотности 0,3 до 0,6. Бактериальные клетки осаждают центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин), осадок бактериальных клеток промывают в 5 мл, 10 mM раствора MgSO<sub>4</sub> и центрифугируют (3000 об/мин, 10 мин). Осадок ресуспендируют в 10 мл пре-индуцирующей среды, содержащей соли среды АВ (NH<sub>4</sub>Cl - 20 г/л, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 6 г/л, KCl - 3 г/л, CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O - 0,264 г/л, FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O - 50мг/л), 2мM фосфатный буфер натрия, 1% глюкозу и ацетосирингон в концентрации 100 μM.

Далее экспланты, инокулируют в суспензии клеток агробактерий в течение 20-30 минут. После проведения этапа ко-культивации экспланты не отмывая переносят на твердую среду MS, содержащей ацетосирингон в концентрации 100 μM и инкубируют в течение 2-3 суток при температуре 28±2°C.

После ко-культивирования экспланты высаживают на селективную питательную среду, содержащей фитогормоны для прямой регенерации и ацетосирингон в концентрации 100 μM. Пассирование трансформированных эксплантов проводят через каждые 10 дней.

**Пример 4. Прямая регенерация трансформированных сортов картофеля**

Морфологический потенциал культивируемых тканей зависит от органа, из которого взят эксплант, его физиологического возраста, размера, анатомических и функциональных особенностей. При выборе экспланта используют следующие части растения картофеля сортов Астаналык, Токтар и Аксор: сегменты стебля и листьев.

Из всех сортов получают трансформированные растений-регенеранты. Количество микропобегов из одного экспланта варьируют от 1 до 10 в зависимости от сорта и питательной среды для прямой регенерации. Сорта Аксор, Тохтар и Астаналык обладают более высокой способностью к прямому органогенезу, образуя множество побегов на один эксплант (рисунок 6).

При изучении трансформированных эксплантов картофеля на индукцию морфогенеза показывают, что среда с 1,0 мг/л зеатина, 10 мг/л гибберелловой кислоты и 0,1 мг/л НУК дает самый высокий показатель.

#### **Пример 5. Мониторинг растений-регенерантов картофеля на наличие и экспрессии целевых генов**

Существует достаточно много способов выделения ДНК из растительных объектов. Одним из наиболее широко применяемых является СТАВ метод. Листья растений-трансформантов используют для выделения геномной ДНК на гомогенизаторе, затем ставят ПЦР для анализа на наличие целевых вставок. Качество выделенной геномной ДНК определяют при помощи электрофореза, концентрацию измеряют на спектрофотометре (нанодропе).

ПЦР мониторинг проводят с помощью Taq-ДНК полимеразы и следующих праймеров: прямой (F – ATTGCCTTGTCACAGATAGGACTC) и обратный (R – TAACGAGTCCTATCTGTGACAAGG), используемых для сиквенса целевого гена.

Продукты ПЦР анализируют в 1% агарозном геле (рисунок 7).

#### **Пример 6. Качественный анализ**

Содержание крахмала в клубне зависит от ферментативных реакций как синтеза, так и расщепления крахмала. Поэтому из-за значительного различия молекулярных свойств амилозы и амилопектина физико-химические свойства крахмала в зависимости от содержания этих полисахаридов заметно варьируют. Известно, что и амилоза, и амилопектин способны к образованию комплексов с йодом [Davis H., Skrzypek W., Khan A. Iodine binding by amylopectin and stability of the amylopectin–iodine complex. *J. Polymer. Sci. Polymer. Chem.* 1994;32(12):2267-2274. DOI 10.1002/pola.1994.080321208.].

Микроклубни растений-регенерантов с редактированным геномом при помощи технологии CRISPR/Cas анализируют на наличие амилозы и амилопектина. Для этого, позитивные растения-трансформанты пересаживают на питательную среду для клубнеобразования, содержащие следующие компоненты: 9% сахараза, 1 мг/л аскорбиновая кислота, 0,5 мг/л кинетин и 3 мг/л ИМК. Спустя 45-50 дней образовавшиеся микроклубни тонко нарезают скальпелем и анализируют с помощью раствора йода (2 г I<sub>2</sub> и 2 г KI на 100 мл раствора) под световым микроскопом. Контрольные крахмальные зерна окрашиваются в цвет от голубого, слабо-фиолетового до интенсивного синего, почти черного. Крахмальные зерна в микроклубнях с редактированным геномом под действием йодсодержащих реактивов окрашиваются в красноватый цвет с оттенками от желтого до коричневого (за счет преобладания амилопектина в молекуле крахмала), показано на рисунке 8.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Применение технологии CRISPR/Cas для редактирования генома казахстанских сортов картофеля **отличающиеся тем, что** целевые таргеты выбирают в первом экзоне гена кодирующего гранул связанную синтазу крахмала, бинарные вектора для экспрессии элементов системы CRISPR/Cas создают с помощью двухступенчатой системы клонирования, для редактирование генома используют сорта картофеля казахстанской селекции, микроклубни картофеля сортов казахстанской селекции с улучшенным свойством крахмала получают с помощью *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, факт экспрессии генов кодирующие целевой таргет и белок Cas9 подтверждают методом полимеразной цепной реакции, анализ амилозы и амилопектина в крахмале контрольных и трансформированных растений проводят с раствором йода.

**«ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS  
 ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА  
 КАЗАХСТАНСКИХ СОРТОВ  
 КАРТОФЕЛЯ»**

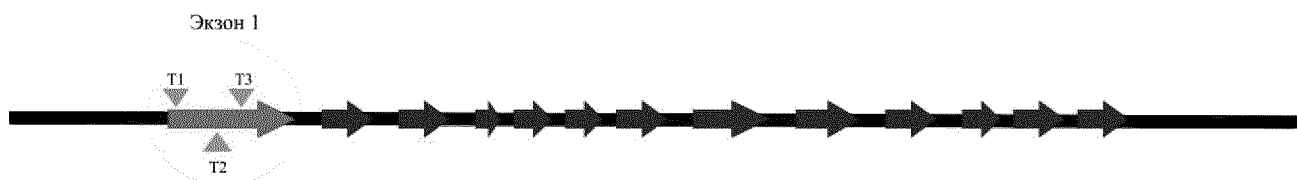


Рисунок 1 – Сайты редактирования гена *GBSS*: синие стрелки – экзоны 2-13; серые – интронная часть гена; красной стрелкой обозначен экзон-1, розовые – целевые таргеты

**«ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS  
 ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА  
 КАЗАХСТАНСКИХ СОРТОВ  
 КАРТОФЕЛЯ»**

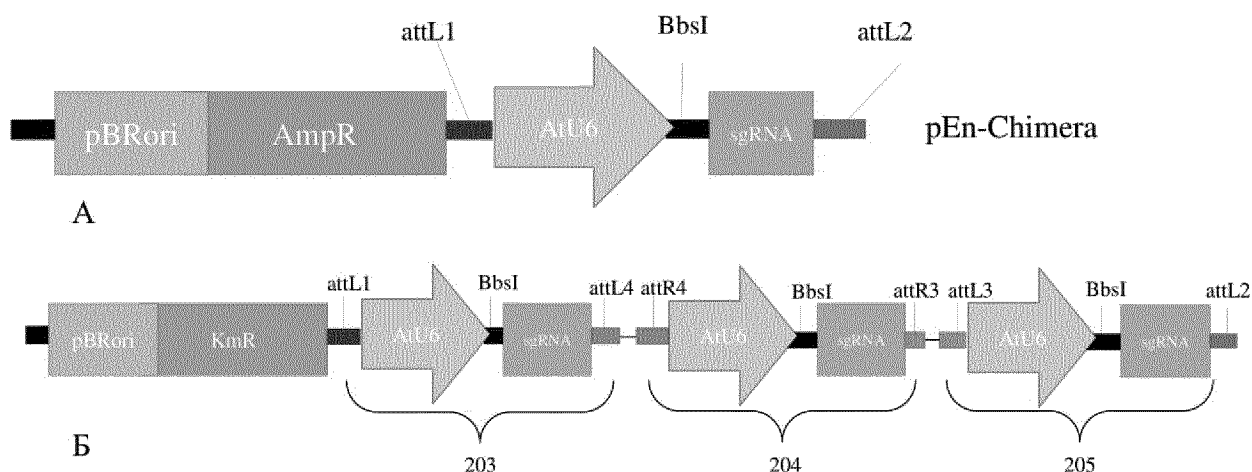


Рисунок 2 – Вектор для клонирования sgRNA (pU6sgRNA): А – один ген sgRNA;  
 Б – три гена sgRNA



**«ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS  
 ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА  
 КАЗАХСТАНСКИХ СОРТОВ  
 КАРТОФЕЛЯ»**

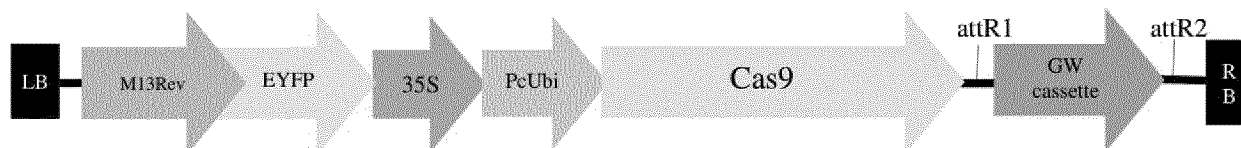
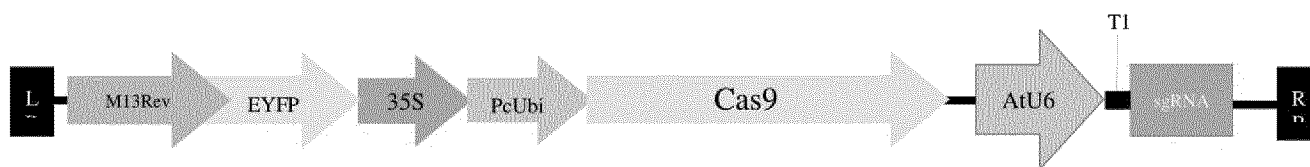


Рисунок 3 –Бинарный вектор для экспрессии системы CRISPR/Cas

**«ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS  
 ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА  
 КАЗАХСТАНСКИХ СОРТОВ  
 КАРТОФЕЛЯ»**

**А**



**Б**

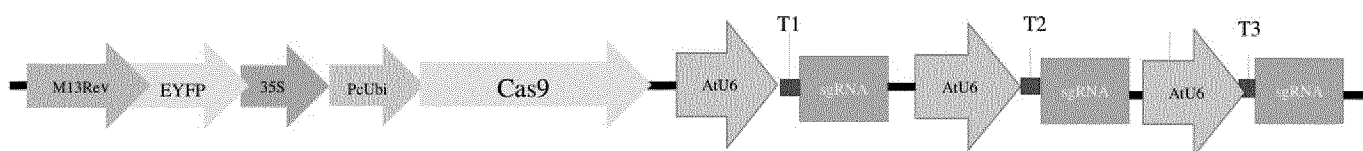


Рисунок 4 –Экспрессионные векторасистемы CRISPR/Cas: А – с одним таргетомpMR287 (pYUCas9Plus);  
 Б – с тремя таргетами pMR287 (pYUCas9Plus)

**«ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS  
ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА  
КАЗАХСТАНСКИХ СОРТОВ  
КАРТОФЕЛЯ»**

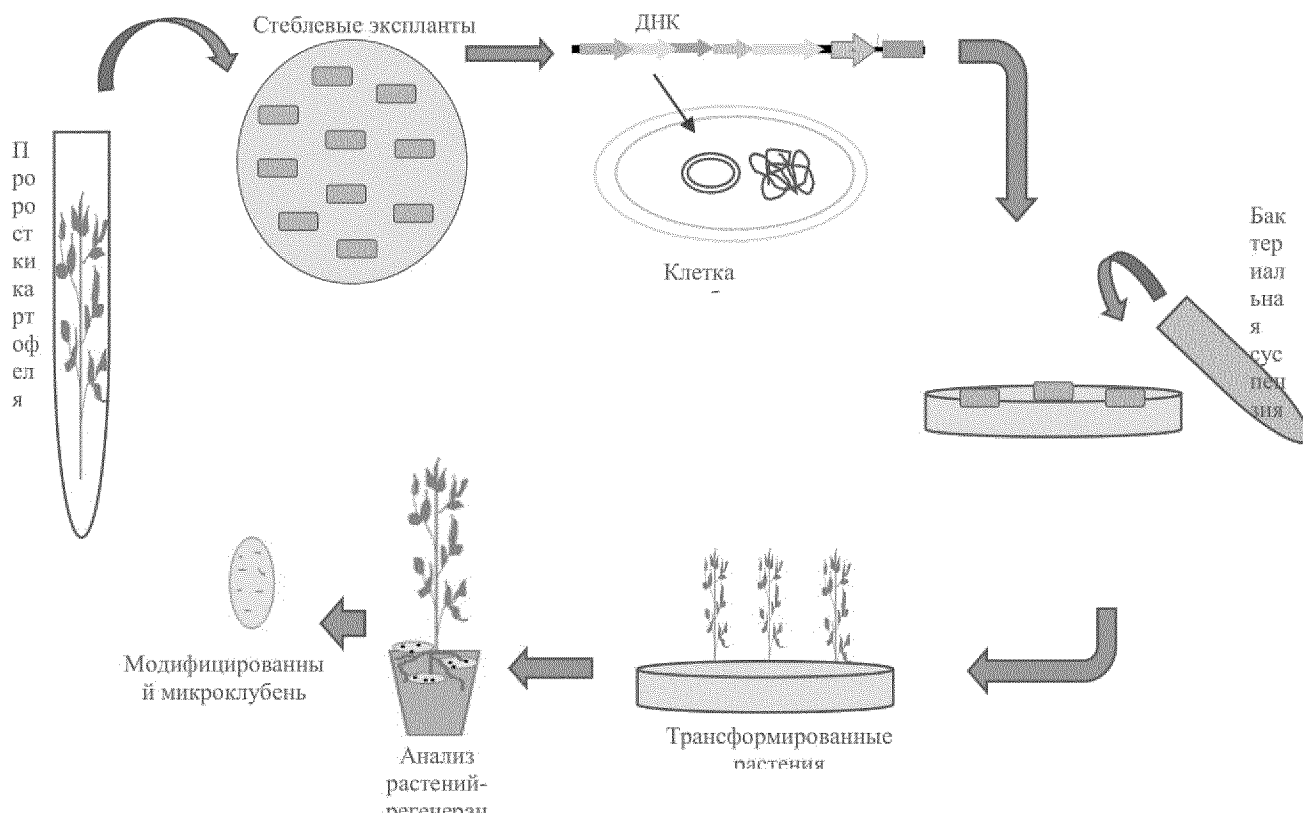


Рисунок 5– Схема агробактериальной трансформации картофеля

**«ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS  
ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА  
КАЗАХСТАНСКИХ СОРТОВ  
КАРТОФЕЛЯ»**

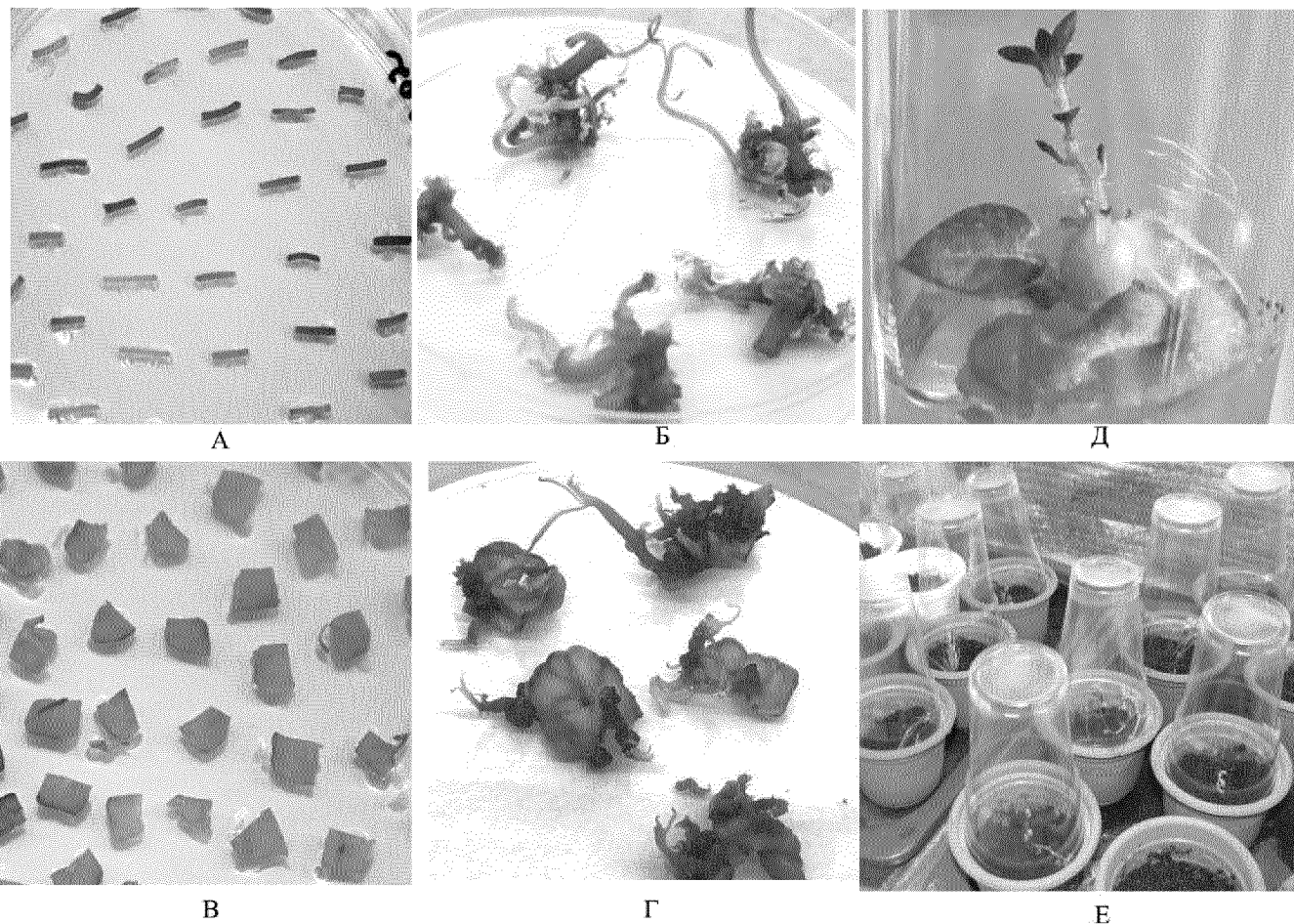


Рисунок 6– Прямая регенерация картофеля: А – стеблевые экспланты; Б – 4-5 недельные проростки из стеблевых эксплантов; В – листовые экспланты; Г – 5-недельные экспланты из листьев; Д – образование микроклубни на оптимизированной питательной среде; Е – посадка на почву и размножение микроклубней

**«ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS  
ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА  
КАЗАХСТАНСКИХ СОРТОВ  
КАРТОФЕЛЯ»**

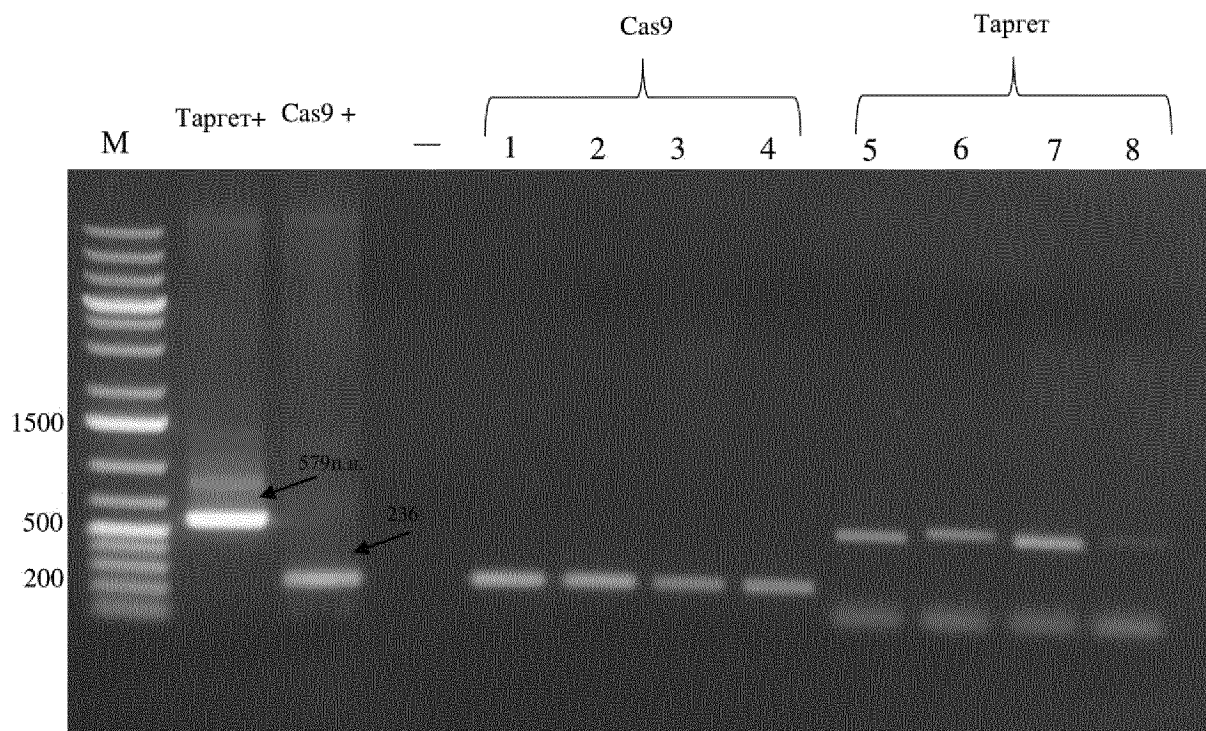


Рисунок 7 – Электрофорез ПЦР-продуктов растения-трансформантов на наличие элементов CRISPR/Cas9, амплифицированных с праймерами, специфичными к гену Cas9 и целевым таргетам, в 1% агарозном геле

**«ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS  
ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА  
КАЗАХСТАНСКИХ СОРТОВ  
КАРТОФЕЛЯ»**

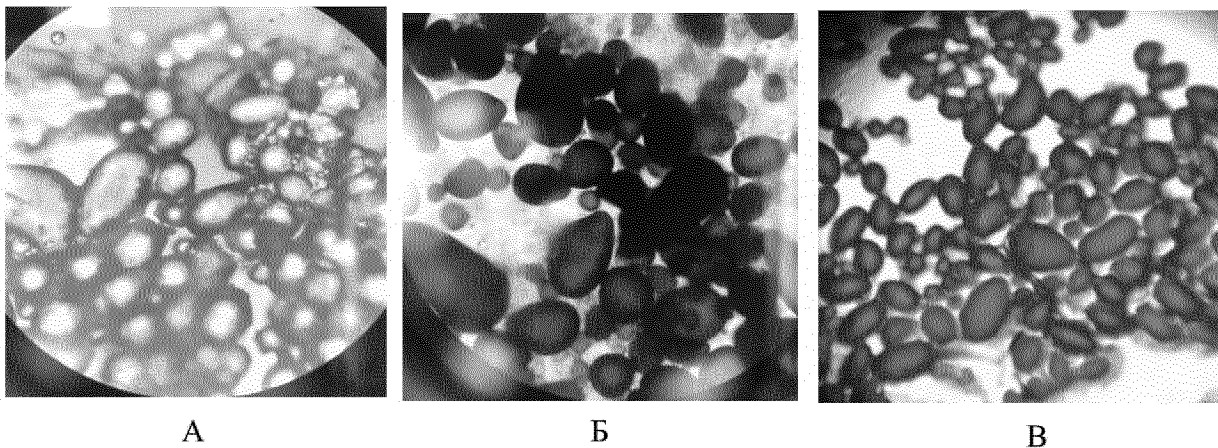


Рисунок 8 – Микроскопический анализ крахмальных зерен: А – крахмал контрольных растений (сорт Аксор); Б – крахмал контрольных растений окрашенных йодом; В – крахмал трансформированных растений окрашенных йодом (сорт Аксор pMR278/6)

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202092075**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

*C12N 15/82 (2006.01)*  
*A01H 1/06 (2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)  
C12N 15/82, A01H 1/06

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	L.S. ABEUOVA et al. Establishment of CRISPR/Cas9 system with multiple guide RNAs for potato genome editing. Abstracts/Journal of Biotechnology, 2019, 305S, S12-S32, с. 20-21.	1
Y	FLORIAN VEILLET et al. The Solanum tuberosum GBSSI gene: a target for assessing gene and base editing in tetraploid potato, Plant Cell Rep, 2019, Vol.38, N.9, pp.1065-1080, реферат, с.1068, 1069.	1

последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

«P» - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

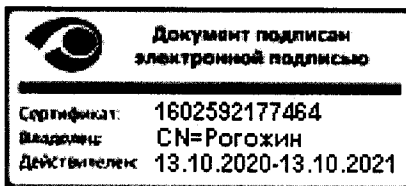
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **20/04/2021**

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы



Д.Ю. Рогожин