

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291443** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.10.25

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

(22) Дата подачи заявки
2020.12.07

(54) **УЛУЧШЕННОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПАРНЫХ
НИКАЗ**

(31) **19216386.3; 20155128.0; 20211151.4**

(32) **2019.12.16; 2020.02.03; 2020.12.02**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2020/084799**

(87) **WO 2021/122080 2021.06.24**

(71) Заявитель:

**БАСФ АГРИКУЛЬЧУРАЛ
СОЛЮШНС СИД УС ЛЛСИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Д'Халлэйи Кателейн, Голдс Тимоти
Джеймс, Де Флессхаувэр Давид (BE)**

(74) Представитель:

Беяева Е.Н. (BY)

(57) Редактирование генома, включающее введение точных изменений генов, является общепризнанным методом при работе с диплоидными растениями. Общепризнанные методы в данной области техники предусматривают введение разрывов двухцепочечной ДНК в геном растения с применением таких технологий, как цинк-пальцевые нуклеазы, хоуминг-эндонуклеазы, TALEN или РНК-управляемая нуклеаза, например Cas9 или Cas12a.

202291443

A1

A1

202291443

Улучшенное редактирование генома с использованием парных нуклеаз

Описание изобретения

Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии растений и направлено на способ улучшенного редактирования генома сельскохозяйственных культур, предпочтительно аллоплоидных и/или полиплоидных.

Введение

Редактирование генома, включая введение точных изменений генов, является общепризнанным методом при работе с диплоидными растениями. Общепризнанные методы в данной области науки предусматривают введение разрывов двухцепочечной ДНК в геном растения с применением таких технологий, как цинк-пальцевые нуклеазы, хоуминг-эндонуклеазы, TALEN или РНК-управляемая нуклеаза, например, Cas9 или Cas12a.

Редактирование генома, применяемое в клетках растений, например, эмбрионов, каллуса или протопласта, достаточно эффективно и приводит к мутациям, включающим случайные вставки и/или делеции (инсерционно-делеционные мутации), если двухцепочечный разрыв в геноме восстанавливается с помощью склонного к ошибкам негомологичного соединения концов (НГСК), до неизменных геномных последовательностей, если подход к редактированию не сработал, или же к точному редактированию (ТР), если разрыв устранен гомологической рекомбинацией, которая обычно представлена механизмом, меньше всего встречающимся при репарации двухцепочечных разрывов у растений.

У диплоидных растений это привело бы к появлению следующих генотипов: WT/WT, WT/InDel, InDel/InDel, PE/WT, PE/InDel или PE/PE. В случаях, когда предполагается точное редактирование и случайных мутаций следует избегать, предпочтительной комбинацией будет PE/WT или PE/PE. Системы скрининга этих комбинаций всегда доступны в готовом виде, и с повышением эффективности редактирования геномов в диплоидных растениях требуется скрининг только объективно необходимого количества клеток.

Тем не менее, в аллоплоидных и/или полиплоидных организмах количество потенциальных комбинаций увеличивается, и необходимо проводить скрининг огромного количества клеток, чтобы избежать растительных клеток, содержащих инсерционно-делеционные мутации, и идентифицировать предпочтительную комбинацию более чем в одном геноме, которая присутствует в аллоплоидных и/или полиплоидных растениях. Для снижения стоимости и трудоемкости скрининга в данной области науки существует необходимость в создании способов с пониженным процентным содержанием инсерционно-делеционных мутаций и более высоким процентным содержанием ТР.

Такие методы особенно интересны при работе с аллоплоидными и/или полиплоидными культурами, такими как пшеница, тритикале, хлопчатник, картофель, масличный рапс, лук-порей, табак, арахис, овес, киви, банан, клубника, сахарный тростник, ока, а также некоторые сорта яблок и киноу.

Негомологичное соединение концов возникает в основном, когда в месте двухцепочечного разрыва ДНК отсутствует ДНК, обеспечивающая восстановление гомологичной рекомбинации. Для восстановления гомологичной рекомбинации необходимы участки ДНК, имеющие определенную степень гомологии с ДНК в месте двухцепочечного разрыва или в непосредственной близости от него. Эта гомологичная ДНК может присутствовать в геноме растения или на донорной ДНК, состоящей из 3'- и/или 5'-концевых областей с определенной степенью гомологии с геномной ДНК в месте двухцепочечного разрыва или в непосредственной близости от него. Тем не менее, даже если донорная ДНК вводится в клетку вместе с агентом, индуцирующим двухцепочечный разрыв, она может и не присутствовать в месте разрыва в момент, когда происходит восстановление ДНК.

Настоящее изобретение предусматривает способ с использованием парных нуклеотидов, разрывающих одну или обе цепи двухцепочечной ДНК, что не влечет за собой физическое разделение двухцепочечной ДНК. Такие одноцепочечные разрывы не приведут к появлению двухцепочечного разрыва, но при этом пары оснований между разрывами будут удерживать комплементарные цепи ДНК вместе, сохраняя водородные связи между комплементарными основаниями двух цепей неизменными. Восстановление приведет к получению последовательности дикого типа или к точному редактированию гена, если в разрыве во время восстановления присутствует соответствующая молекула донорной ДНК с

гомологичными липкими концами на 3'- и/или 5'-конце, и такой процент случайных инсерционно-делеционных мутаций уменьшается.

В EP3138912 описаны парные никазы Cas9, которые обеспечивают внедрение двухцепочечного разрыва в геном клетки растения для снижения процента нецелевых двухцепочечных разрывов, вносимых одиночной Cas9-нуклеазой, связывающейся с нецелевыми сайтами, которые имеют определенную гомологию с направляющей РНК. Авторы прямо отмечают, что никазам необходимо образовывать одноцепочечные разрывы достаточно близко, чтобы стимулировать появление двухцепочечных разрывов. Тем не менее, они не дают никаких рекомендаций относительно того, какое расстояние будет достаточно близким для образования двухцепочечных разрывов, а также не предоставляется никакой информации по вопросу снижения процента инсерционно-делеционных мутаций в процессе восстановления.

В работе Mali et al (2013) раскрывается использование парных никаз Cas9 в диплоидных клетках человека для стимулирования инсерционно-делеционных мутаций без совместной доставки молекул донорной ДНК.

В работах Schiml et al (2014) и Fauser et al (2014) описано использование парных никаз Cas9 или одиночной никазы Cas9 в диплоидных клетках арабидопсиса для индуцирования внутривромосомной гомологической рекомбинации без совместной доставки молекул донорной ДНК.

В работе Mikami et al (2016) описано использование парных никаз Cas9 в диплоидных клетках риса для снижения процента нецелевых мутаций без совместной доставки молекул донорной ДНК.

В работе Wolter et al (2018) описано использование парных никаз Cas9 в диплоидных клетках арабидопсиса для индуцирования внутривромосомной гомологической рекомбинации без совместной доставки молекул донорной ДНК. Кроме того, они показывают систему направленного воздействия на гены у арабидопсиса в полевых условиях, которая основана на донорной ДНК, вырезанной из генома растения перед рекомбинацией в другом локусе генома, что только введение двухцепочечных разрывов ДНК в целевом локусе приводит к значительному количеству случаев точного редактирования генов в геноме растений, в то время как с использованием никазы или парных никаз не было

выявлено практически никаких или вообще никаких случаев истинного направленного воздействия на гены. Основная часть событий, которые были получены при использовании парной системы, представляла собой события эктопической рекомбинации.

В данной области науки существует потребность в эффективном и надежном введении донорной ДНК в заданные области генома аллоплоидных и/или полиплоидных растений, предпочтительно аллоплоидных и/или полиплоидных сельскохозяйственных культур, с использованием недавно разработанного метода CRISPR. Более того, в данной области науки существует потребность в повышении эффективности введения донорной ДНК в геном растений, предпочтительно аллоплоидных и/или полиплоидных растений, например, аллоплоидных и/или полиплоидных сельскохозяйственных культур, за счет уменьшения доли инсерционно-делеционных мутаций, встречающихся в геноме растений.

Подробное описание изобретения

Первый вариант осуществления изобретения касается способа введения, по меньшей мере, одной молекулы донорной ДНК в, по меньшей мере, одну целевую область генома клетки растения, предпочтительно клетки культурного растения, более предпочтительно клетки аллоплоидного или полиплоидного, или аллоплоидного и полиплоидного культурного растения, наиболее предпочтительно клетки пшеницы, включающего следующие этапы:

- a. введение в указанную клетку растения
 - i. молекулы донорной ДНК и
 - ii. по меньшей мере, одной РНК-управляемой системы и
 - iii. по меньшей мере, двух одиночных направляющих РНК (сгРНК) или, по меньшей мере, двух CRISPR-РНК (крРНК) и транскрибирующей РНК (тракрРНК) и
- b. инкубирование клетки растения для введения указанной, по меньшей мере, одной донорной ДНК в, по меньшей мере, одну указанную целевую область генома и
- c. выбор клетки растения, содержащей последовательность молекулы донорной ДНК в указанной целевой области,

причем никаза создает, по меньшей мере, два одноцепочечных разрыва на противоположных цепях в или на одной цепи в целевом сайте, т.е. в или около целевой области геномной ДНК клетки растения, предпочтительно клетки культурного растения, более предпочтительно клетки аллоплоидного или полиплоидного, или аллоплоидного и полиплоидного культурного растения, наиболее предпочтительно клетки пшеницы и

причем эти одноцепочечные разрывы представляют собой, по меньшей мере, 20 пар оснований отдельно друг от друга и

причем пары оснований между одноцепочечными разрывами не растворяются и удерживают двойную цепь ДНК вместе, сохраняя нетронутыми водородные связи между комплементарными основаниями, и

причем каждый сайт разрыва находится рядом, по меньшей мере, с одной последовательностью смежного с протоспейсером мотива, и

причем, по меньшей мере, две сгРНК или, по меньшей мере, две тракрРНК и крРНК направляют, по меньшей мере, одну РНК-управляемую никазу в сайты-мишени.

В предпочтительном варианте осуществления разрывы представляют собой, по меньшей мере, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 пар оснований отдельно друг от друга, но не более чем 200, 195, 190, 185, 180, 175, 170, 165, 160 или 155 пар оснований отдельно друг от друга.

В одном варианте осуществления донорная ДНК функционально связана с, по меньшей мере, 30 основаниями на ее 5' и/или 3' конце, каждое из которых, по меньшей мере, на 80% идентично последовательности в целевой области, предпочтительно донорная ДНК функционально связана на ее 5' и/или 3' конце с такой последовательностью. Предпочтительно последовательность на, по меньшей мере, одной стороне донорной ДНК, предпочтительно на обеих сторонах донорной ДНК содержит, по меньшей мере, 40, по меньшей мере, 50, по меньшей мере, 60, по меньшей мере, 70, по меньшей мере, 80, по меньшей мере, 90 или, по меньшей мере, 100 оснований. Более предпочтительно последовательность на, по меньшей мере, одной стороне донорной ДНК, предпочтительно на обеих сторонах донорной ДНК содержит, по меньшей мере, 150 оснований, по меньшей мере, 200 оснований,

по меньшей мере, 300 оснований, по меньшей мере, 350 оснований или, по меньшей мере, 400 оснований. Эти основания, по меньшей мере, на 80%, предпочтительно, по меньшей мере, на 85%, предпочтительно на 90%, предпочтительно на 91%, 92%, 93% или 94% идентичны соответствующей 5' и 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва, введенного РНК-управляемой никазой. Более предпочтительно эти основания, по меньшей мере, на 95% идентичны, на 96% идентичны, на 97% идентичны, на 98% идентичны или на 99% идентичны соответствующей 5' и 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва, введенного РНК-управляемой никазой. В наиболее предпочтительном варианте осуществления, эти основания на 100% идентичны соответствующей 5' и 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва, введенного РНК-управляемой никазой.

В одном варианте осуществления, по меньшей мере, 30 оснований на 5' и/или 3' конце донорной ДНК на 100% идентичны соответствующей 5' и/или 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва, где донорная ДНК или ее последовательность вставлены в геномную ДНК. В другом варианте осуществления, по меньшей мере, 40 или 50 оснований на 5' и/или 3' конце донорной ДНК, по меньшей мере, на 98% идентичны соответствующей 5' и/или 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва. В еще одном варианте осуществления, по меньшей мере, 60 или 70 оснований на 5' и/или 3' конце донорной ДНК, по меньшей мере, на 95% идентичны соответствующей 5' и/или 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва. В предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере, 80 или 90 оснований на 5' и/или 3' конце донорной ДНК, по меньшей мере, на 92% идентичны соответствующей 5' и/или 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва. В более предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере, 100 оснований на 5' и/или 3' конце донорной ДНК, по меньшей мере, на 90% идентичны соответствующей 5' и/или 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва. В более предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере, 150 или 200 оснований на 5' и/или 3' конце донорной ДНК, по меньшей мере, на 85% идентичны соответствующей 5' и/или 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва. В еще одном предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере, 250, 300, 350 или 400 оснований на 5' и/или 3'

конце донорной ДНК, по меньшей мере, на 80% идентичны соответствующей 5' и/или 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва.

В одном варианте осуществления изобретения молекула донорной ДНК является одноцепочечной, в другом варианте осуществления, молекула донорной ДНК является двухцепочечной. В одном варианте осуществления длина молекулы донорной ДНК составляет не более чем 10 нуклеотидов, в другом варианте осуществления она составляет не более чем 20, 30, 40 или 50 нуклеотидов. В другом варианте осуществления длина молекулы донорной ДНК составляет не более чем 60, 70, 80, 90 или 100 нуклеотидов. В другом варианте осуществления, длина молекулы донорной ДНК составляет не более чем 125, 150, 200, 300, 400 или 500 нуклеотидов. В другом варианте осуществления, длина молекулы донорной ДНК составляет не более чем 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 или 1500 нуклеотидов. В другом варианте осуществления, длина молекулы донорной ДНК составляет не более чем 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 или 5000 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления молекулу донорной ДНК добавляют к целевой области генома аллоплоидного или полиплоидного растения, предпочтительно аллоплоидной или полиплоидной культуры и не замещает геномную ДНК. В другом варианте осуществления молекула донорной ДНК замещает последовательность в целевой области аллоплоидного или полиплоидного растения, предпочтительно геноме аллоплоидной или полиплоидной культуры, который короче, такой же длины или длиннее, чем молекула донорной ДНК.

В одном варианте осуществления молекула донорной ДНК содержит последовательность, которая не присутствует в целевой области аллоплоидного или полиплоидного растения, предпочтительно геноме аллоплоидной или полиплоидной культуры. Путем введения такой молекулы ДНК в целевую область аллоплоидного или полиплоидного растения, предпочтительно геном аллоплоидной или полиплоидной культуры, дополнительную ДНК добавляют к геному, который может содержать регуляторные области, такие как промотор, интрон, энхансер или терминатор, он может содержать транскрибируемые участки, такие как ОРС или может кодировать некодирующие РНК, такие как предшественники микроРНК, длинные некодирующие РНК и т.п., или может содержать один или более экспрессионных конструктов. В другом варианте

осуществления молекула донорной ДНК содержит последовательности, гомологичные целевой области аллоплоидного или полиплоидного растения, предпочтительно геному аллоплоидной или полиплоидной культуры, но содержит одно или более точных изменений гена, которые отличаются от последовательности дикого типа в целевой области генома. Такие молекулы донорной ДНК заменяют соответствующие последовательности в геноме, тем самым внося точные изменения генов в аллоплоидное или полиплоидное растение, предпочтительно геном аллоплоидной или полиплоидной культуры.

Клетка растения предпочтительно происходит из аллоплоидного или полиплоидного растения, такого как хризантема, георгин или шафран посевной, предпочтительно аллоплоидной или полиплоидной культуры, например, пшеница, тритикале, хлопок, картофель, масличный рапс, лук-порей, табак, арахис, овес, киви, банан, клубника, арбуз без косточек, банан, цитрусовые, сахарный тростник, ока, а также некоторые сорта яблок и кинноу.

Инкубация клетки растения для введения донорной ДНК в геном клетки может происходить при любых условиях, которые благоприятны для поддержания жизнеспособности клетки. Температура предпочтительно составляет от 20°C до 32°C, в зависимости, например, от используемой РНК-управляемой нуклеазы. Относительно нуклеазы Cas9 (nCas9) температура предпочтительно составляет от 18°C до 30°C, более предпочтительно от 20°C до 28°C, наиболее предпочтительно от 22°C до 26°C. Относительно нуклеазы Cas12a (nCas12a) температура предпочтительно составляет от 22°C до 32°C, более предпочтительно от 24°C до 30°C, наиболее предпочтительно от 28°C до 30°C.

Клетки предпочтительно инкубируют в условиях чередования 16 часов света и 8 часов темноты, предпочтительно в условиях слабого освещения, более предпочтительно в темноте. Время инкубации в указанных условиях составляет от 1 дня до 7 недель, предпочтительно от 5 недель до 7 недель.

РНК-управляемая нуклеаза направляется к целевому сайту под воздействием соединенных кРНК и тракРНК или одиночной направляющей РНК соответственно. Целевой сайт примыкает к последовательности РАМ, которая является специфичной для используемой РНК-управляемой нуклеазы.

Если в геномной ДНК соответствующей клетки имеются одноцепочечные разрывы двух сайтов-мишеней, то по меньшей мере, две гибридизированные крРНК и тракрРНК или, по меньшей мере, две одиночные направляющие РНК или, по меньшей мере, одна гибридизированная крРНК и тракрРНК и, по меньшей мере, одна одиночная направляющая РНК вводятся в клетку, и каждая из них нацеливает соответствующую нишу на ее сайт-мишень, смежный с последовательностью смежного с протоспейсером мотива.

Еще одним вариантом реализации изобретения является способ получения растения, предпочтительно культурного растения, более предпочтительно аллоплоидного или полиплоидного культурного растения, наиболее предпочтительно растения пшеницы, содержащего донорную ДНК, причем эта донорная ДНК предпочтительно содержит точное редактирование гена, включающее возможные этапы:

- a. введение в клетку указанного растения
 - i. молекулы донорной ДНК и
 - ii. по меньшей мере одной РНК-управляемой ниши и
 - iii. по меньшей мере двух сгРНК или меньше по мере двух крРНК и тракрРНК и
- b. инкубирование клетки растения для введения указанной, по меньшей мере, одной донорной ДНК в целевую область генома указанной клетки растения, и
- c. выбор клетки растения, содержащей последовательность молекулы донорной ДНК в указанной целевой области, и
- d. регенерация растения из указанной выбранной клетки растения, причем ниша создает, по меньшей мере, два одноцепочечных разрыва на противоположных цепях или на одной цепи в месте сайта-мишени, т.е. в или около целевой области геномной ДНК клетки растения, предпочтительно клетки культурного растения, более предпочтительно клетки аллоплоидного или полиплоидного культурного растения, наиболее предпочтительно клетки пшеницы, а также тем, что эти одноцепочечные разрывы находятся на расстоянии, по меньшей мере, 20 оснований друг от друга, и

причем пары оснований между одноцепочечными разрывами не растворяются и удерживают двойную цепь ДНК вместе, сохраняя нетронутыми водородные связи между комплементарными основаниями, и причем каждый сайт разрыва находится рядом по меньшей с одной последовательностью смежного с протоспейсером мотива и отличающейся тем, что, по меньшей мере, две сгРНК или, по меньшей мере, две тракрРНК и крРНК направляют, по меньшей мере, одну РНК-управляемую никазу в сайт-мишень.

В предпочтительном варианте осуществления разрывы представляют собой, по меньшей мере, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 пар оснований отдельно друг от друга, но не более чем 200, 195, 190, 185, 180, 175, 170, 165, 160 или 155 пар оснований отдельно друг от друга.

В одном варианте осуществления донорная ДНК функционально связана с, по меньшей мере, 30 основаниями на ее 5' и/или 3' конце, каждое из которых, по меньшей мере, на 80% идентично последовательности в целевой области, предпочтительно донорная ДНК функционально связана на ее 5' и/или 3' конце с такой последовательностью. Предпочтительно последовательность на, по меньшей мере, одной стороне донорной ДНК, предпочтительно на обеих сторонах донорной ДНК содержит, по меньшей мере, 40, по меньшей мере, 50, по меньшей мере, 60, по меньшей мере, 70, по меньшей мере, 80, по меньшей мере, 90 или, по меньшей мере, 100 оснований. Более предпочтительно последовательность на, по меньшей мере, одной стороне донорной ДНК, предпочтительно на обеих сторонах донорной ДНК содержит, по меньшей мере, 150 оснований, по меньшей мере, 200 оснований, по меньшей мере, 300 оснований, по меньшей мере, 350 оснований или, по меньшей мере, 400 оснований. Эти основания, по меньшей мере, на 80%, предпочтительно, по меньшей мере, 85%, предпочтительно 90%, предпочтительно 91%, 92%, 93% или 94% идентичны соответствующей 5' и 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва, введенного РНК-управляемой никазой. Более предпочтительно эти основания, по меньшей мере, на 95% идентичны, на 96% идентичны, на 97% идентичны, на 98% идентичны или на 99% идентичны

соответствующей 5' и 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва, введенного РНК-управляемой приказой. В наиболее предпочтительном варианте осуществления, эти основания на 100% идентичны соответствующей 5' и 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва, введенного РНК-управляемой приказой.

В одном варианте осуществления, по меньшей мере, 30 оснований на 5' и/или 3' конце донорной ДНК на 100% идентичны соответствующей 5' и/или 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва, где донорная ДНК или ее последовательность вставлены в геномную ДНК. В другом варианте осуществления, по меньшей мере, 40 или 50 оснований на 5' и/или 3' конце донорной ДНК, по меньшей мере, на 98% идентичны соответствующей 5' и/или 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва. В еще одном варианте осуществления, по меньшей мере, 60 или 70 оснований на 5' и/или 3' конце донорной ДНК, по меньшей мере, на 95% идентичны соответствующей 5' и/или 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва. В предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере, 80 или 90 оснований на 5' и/или 3' конце донорной ДНК, по меньшей мере, на 92% идентичны соответствующей 5' и/или 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва. В более предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере, 100 оснований на 5' и/или 3' конце донорной ДНК, по меньшей мере, на 90% идентичны соответствующей 5' и/или 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва. В более предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере, 150 или 200 оснований на 5' и/или 3' конце донорной ДНК, по меньшей мере, на 85% идентичны соответствующей 5' и/или 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва. В еще одном предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере, 250, 300, 350 или 400 на 5' и/или 3' конце донорной ДНК, по меньшей мере, на 80% идентичны соответствующей 5' и/или 3' области двухцепочечного или одноцепочечного разрыва.

В одном варианте осуществления изобретения молекула донорной ДНК является одноцепочечной, в другом варианте осуществления, молекула донорной ДНК является двухцепочечной. В одном варианте осуществления длина молекулы донорной ДНК составляет не более чем 10 нуклеотидов, в другом варианте осуществления она составляет не более чем 20, 30 40 или 50 нуклеотидов. В другом

варианте осуществления длина молекулы донорной ДНК составляет не более чем 60, 70, 80, 90 или 100 нуклеотидов. В другом варианте осуществления, длина молекулы донорной ДНК составляет не более чем 125, 150, 200, 300, 400 или 500 нуклеотидов. В другом варианте осуществления, длина молекулы донорной ДНК составляет не более чем 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 или 1500 нуклеотидов. В другом варианте осуществления, длина молекулы донорной ДНК составляет не более чем 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 или 5000 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления молекулу донорной ДНК добавляют к целевой области генома аллоплоидного или полиплоидного растения, предпочтительно аллоплоидной или полиплоидной культуры и не замещает геномную ДНК. В другом варианте осуществления молекула донорной ДНК замещает последовательность в целевой области аллоплоидного или полиплоидного растения, предпочтительно геноме аллоплоидной или полиплоидной культуры, который короче, такой же длины или длиннее, чем молекула донорной ДНК.

В одном варианте осуществления молекула донорной ДНК содержит последовательность, которая не присутствует в целевой области аллоплоидного или полиплоидного растения, предпочтительно геноме аллоплоидной или полиплоидной культуры. При введении таких молекул ДНК в целевой области аллоплоидного или полиплоидного растения, предпочтительно геноме аллоплоидной или полиплоидной культуры к геному добавляется дополнительная ДНК, которая может содержать регуляторные области, такие как промотор, интрон, энхансер или терминатор, она может содержать транскрибируемые области, такие как ОРС, или может кодировать некодирующие РНК, такие как прекурсоры микро-РНК, длинные некодирующие РНК и т.п., или содержать один или более экспрессионных конструкторов. В другом варианте осуществления молекула донорной ДНК содержит последовательности, гомологичные целевой области аллоплоидного или полиплоидного растения, предпочтительно геноме аллоплоидной или полиплоидной культуры, но при этом содержит один или более случаев точного редактирования гена, которые отличаются от последовательности дикого типа в целевой области генома пшеницы. Такие молекулы донорной ДНК замещают соответствующие последовательности в геноме, за счет чего происходит

точное редактирование генов в аллоплоидном или полиплоидном растении, предпочтительно геноме аллоплоидной или полиплоидной культуры.

Клетка растения предпочтительно происходит из аллоплоидного или полиплоидного растения, такого как хризантема, георгин или шафран посевной, предпочтительно аллоплоидной или полиплоидной культуры, например, пшеница, тритикале, хлопок, картофель, масличный рапс, лук-порей, табак, арахис, овес, киви, банан, клубника, арбуз без косточек, банан, цитрусовые, сахарный тростник, ока, а также некоторые сорта яблок и кинноу.

Инкубация клетки растения для введения донорной ДНК в геном клетки может происходить при любых условиях, которые благоприятны для поддержания жизнеспособности клетки. Температура предпочтительно составляет от 20°C до 32°C, в зависимости, например, от используемой РНК-управляемой никазы. Относительно никазы Cas9 (nCas9) температура предпочтительно составляет от 18°C до 30°C, более предпочтительно от 20°C до 28°C, наиболее предпочтительно от 22°C до 26°C. Относительно никазы Cas12a (nCas12a) температура предпочтительно составляет от 22°C до 32°C, более предпочтительно от 24°C до 30°C, наиболее предпочтительно от 28°C до 30°C.

Клетки предпочтительно инкубируют в условиях чередования 16 часов света и 8 часов темноты, предпочтительно в условиях слабого освещения, более предпочтительно в темноте. Время инкубации в указанных условиях составляет от 1 дня до 7 недель, предпочтительно от 5 недель до 7 недель.

РНК-управляемая никаза направляется к целевому сайту под воздействием соединенных крРНК и тракрРНК или одиночной направляющей РНК соответственно. Целевой сайт примыкает к последовательности РАМ, которая является специфичной для используемой РНК-управляемой никазы.

Если в геномной ДНК соответствующей клетки имеются одноцепочечные разрывы двух сайтов-мишеней, то по меньшей мере, две гибридные крРНК и тракрРНК или, по меньшей мере, две одиночные направляющие РНК или, по меньшей мере, одна гибридная крРНК и тракрРНК и, по меньшей мере, одна одиночная направляющая РНК вводятся в клетку, и каждая из них нацеливает соответствующую никазу на ее сайт-мишень, смежный с последовательностью смежного с протоспейсером мотива.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является способ в соответствии с описанием выше, отличающийся тем, что после этапа b. клетку растения инкубируют на среде, содержащей селективный агент.

Негативные селективные маркеры придают устойчивость к биоцидному соединению, такому как ингибитор метаболизма (например, 2-дезоксиглюкоза-6-фосфат, WO 98/45456), антибиотики (например, канамицин, G 418, блеомицин или гигромицин) или гербициды (например, фосфинотрицин или глифосат). Особенно предпочтительными негативными селективными маркерами являются маркеры, которые придают устойчивость к гербицидам. Некоторые из этих маркеров, помимо их функции в качестве маркера, могут использоваться для придания полученному растению свойства устойчивости к гербицидам. В качестве примеров можно отметить следующие:

- Фосфинотрицинацетилтрансфераза (ФАТ; также называемая устойчивостью к биалофосу; бар; de Block et al. (1987) EMBO J 6:2513-2518; EP 0 333 033; US 4,975,374)
- 5-энолпирувилшिकимат-3-фосфатсинтаза (EPSPS; US 5,633,435) или ген глифозат-оксидоредуктазы (US 5,463,175), придающий устойчивость к глифосату (N-фосфонометилглицину)(Shah et al. (1986) Science 233: 478)
- Ферменты, разлагающие глифосат (глифозат-оксидоредуктаза; gox),
- Далапон, инактивирующий дегалогеназы (deh)
- Ацетолактатсинтазы, инактивирующие сульфонилмочевину и имидазолинон (например, мутированные варианты ALS с, например, мутацией S4 и/или Hra)
- Нитрилазы, разрушающие бромоксинил (bxn)
- Канамицин- или G418-гены устойчивости (NPTII; NPTI), кодирующие, например, неомицинофосфотрансферазу (Fraley et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:4803), которая экспрессирует фермент, придающий устойчивость к антибиотику канамицину и родственными антибиотикам неомицину, паромомицину, гентамицину и G418,
- 2-дезоксиглюкозо-6-фосфатфосфатаза (генный продукт DOGR1; WO 98/45456; EP 0 807 836), придающая устойчивость к 2-дезоксиглюкозе (Randez-Gil et al. (1995) Yeast 11:1233-1240)
- Гигромицинофосфотрансфераза (ГФТ), которая способствует устойчивости к гигромицину (Vanden Elzen et al. (1985) Plant Mol Biol. 5:299).

- Дигидрофолатредуктаза (Eichholtz et al. (1987) *Somatic Cell and Molecular Genetics* 13, 67-76)

Среди других негативных селективных маркерных генов бактериального происхождения, которые придают устойчивость к антибиотикам, ген *aadA*, который придает устойчивость к антибиотику спектиномицину, гентамицинацетилтрансферазе, стрептомицинофосфоттрансферазе (СФТ), аминогликозид-3-аденилтрансферазе и детерминанте устойчивости к блеомицину (Svab et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 14:197; Jones et al. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210:86; Hille et al. (1986) *Plant Mol. Biol.* 7:171 (1986); Hayford et al. (1988) *Plant Physiol.* 86:1216).

Негативные селективные маркеры могут дополнительно придавать устойчивость к токсическим эффектам, вызванным такими D-аминокислотами, как, например, D-аланин и D-серин (WO 03/060133; Erikson et al. (2004) *Nat Biotechnol.* 22(4):455-8), например, ген *daol* (EC: 1.4. 3.3: GenBank Acc.-№: U60066) из дрожжей *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospiridium toruloides*) и ген кишечной палочки *dsdA* (D-сериндегидратаза (D-сериндеаминаза) [EC: 4.3. 1.18; GenBank Acc.-№: J01603). В зависимости от используемой D-аминокислоты маркеры оксидазы D-аминокислот могут использоваться в качестве маркеров двойного назначения, обеспечивающих негативную селекцию (например, в сочетании, например, с D-аланином или D-серином) или встречную селекцию (например, в сочетании с D-лейцином или D-изолейцином).

В качестве альтернативы, в способах по изобретению можно применять положительные селективные маркеры. Такие положительные селективные маркеры придают трансформированному растению преимущество в росте по сравнению с нетрансформированным. Такие гены, как изопентенилтрансфераза из *Agrobacterium tumefaciens* (цепочка: PO22; Genbank Acc.-№: AB025109), как ключевой фермент биосинтеза цитокинина, могут способствовать регенерации трансформированных растений (например, путем селекции на среде, не содержащей цитокининов). Описаны соответствующие способы селекции (Ebinuma et al. (2000a) *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2117-2121; Ebinuma et al. (2000b) Селекция безмаркерных трансгенных растений с использованием онкогенов (*ipt*, *rol A*, *B*, *C*) Агробактерии в качестве селективируемых маркеров, в *Molecular Biology of Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers). Дополнительные положительные селективные маркеры, которые придают трансформированному растению

преимущество в росте по сравнению с нетрансформированным, описаны, например, в EP-A 0 601 092. Селекционные маркеры стимуляции роста могут включать (помимо прочего) глюкуронидазу (в сочетании, например, с цитокининглюкуронидом), маннозо-6-фосфатизомеразу (в сочетании с маннозой), УДФ-галактозо-4-эпимеразу (в сочетании, например, с галактозой).

Маркеры контрселекции особенно подходят для отбора организмов с заданными удаленными последовательностями, содержащими указанный маркер (Koprek et al. (1999) *Plant J* 19(6): 719-726). Примеры маркеров контрселекции включают тимидинкиназы (ТК), цитозиндеаминазы (Gleave et al. (1999) *Plant Mol Biol.* 40(2):223-35; Perera et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 23). (4): 793-799; Stougaard (1993) *Plant J* 3:755-761), белки цитохрома P450 (Koprek et al. (1999) *Plant J* 19(6): 719-726), галоалкандегалогеназы (Naested (1999) *Plant J* 18:571-576), продукты гена *iaaH* (Sundaresan et al. (1995) *Gene Develop* 9: 1797-1810), цитозиндезаминазу *codA* (Schlaman and Hooykaas (Schlaman and Hooykaas) 1997) *Plant J* 11:1377-1385), или продукты гена *tms2* (Fedoroff and Smith (1993) *Plant J* 3:273-289).

Согласно способам по изобретению РНК-управляемая никаза может быть представлена любой РНК-управляемой никазой, предпочтительно это Cas-никазами. Специалистам известно множество Cas-никаз, описанных в данной области науки. Например, Cas9, Cas12a, Cas12b, CasX, CasY, C2c1, C2c3, C2c2, Cas12k и т.п.

Кроме того, описаны способы выявления новых видов Cas-никазы (US9790490), которые позволяют специалистам в данной области дополнительно выделять до сих пор не известные виды Cas-никаз.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения Cas-никаза представляет собой никазу Cas9 или Cas12a, или рекомбинантный белок dCas9 или dCas12a, слитый до никазной активности, такой как, например, никаза FokI (US9200266).

В еще одном варианте осуществления способов по изобретению никазу или, по меньшей мере, одну сгРНК или, по меньшей мере, одну крРНК и тракрРНК вводят в указанную клетку, кодируемую молекулой нуклеиновой кислоты. Указанная молекула нуклеиновой кислоты может быть представлена молекулой РНК или линейной молекулой ДНК, которая кодирует соответствующую никазу, сгРНК, крРНК и/или тракрРНК, предпочтительно молекула нуклеиновой кислоты представляет собой плазмиду, содержащую кассету экспрессии, кодирующую

указанную, по меньшей мере, одну никазу или, по меньшей мере, одну сгРНК или, по меньшей мере, одну крРНК и тракрРНК.

В предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере, одна никаза представляет собой последовательность, оптимизированную для экспрессии в соответствующем аллоплоидном или полиплоидном растении. Оптимизация последовательности – это технология, которая известна специалистам в данной области. Существуют компьютерные программы, которые адаптируют любую заданную молекулу ДНК или РНК к предпочтительному использованию кодонов в организме, в котором должен экспрессироваться соответствующий белок. Некоторые программы дополнительно допускают мутацию криптических сторон сплайсинга, уменьшение сворачивания РНК и тому подобное.

РНК-управляемая никаза и, по меньшей мере, одна сгРНК или, по меньшей мере, одна крРНК и тракрРНК могут быть введены в клетку с использованием любого способа, известного специалистам в данной области науки. Могут применяться такие способы, как трансформация с помощью *Agrobacterium*, трансфекция с использованием ПЭГ, липопротеинов или других полипептидов, электропорация или баллистические методы, такие как бомбардировка частицами. Предпочтительно в указанную клетку вводят, по меньшей мере, одну РНК-управляемую никазу и, по меньшей мере, одну сгРНК или, по меньшей мере, одну крРНК и тракрРНК в виде рибонуклеопротеина (РНП), собранного за пределами указанной клетки.

В предпочтительном варианте осуществления способов изобретения комбинация донорной ДНК и крРНК/тракрРНК или сгРНК выбрана предварительно для эффективного введения молекулы донорной ДНК в целевую область. В предпочтительном варианте осуществления способов изобретения, по меньшей мере, одну донорную ДНК и, по меньшей мере, одну РНК-управляемую никазу, а также, по меньшей мере, одну одиночную направляющую РНК (сгРНК) или тракрРНК и крРНК вводят в указанную клетку с использованием бомбардировки частицами или с применением метода введения ДНК с помощью агробактерий.

Предпочтительно, по меньшей мере, одна РНК-управляемая никаза содержит клеточный сигнал внутриядерной локализации.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок, GUS – бета-глюкуронидаза, ВАР – 6-бензиламинопурин; 2,4-D – 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота; MS - среда Мурасиге и Скуга; NAA - 1-нафталинуксусная кислота; MES, 2-(N-морфолиноэтансульфоуксусная кислота, IAA индолуксусная кислота; Kan: сульфат канамицина; GA3 - гибберелловая кислота; TimentinTM: тикарциллин динатрий / клавуланат калия, мкл: Микролитр.

Очевидно, что настоящее изобретение не ограничено конкретной методологией или протоколами. Также необходимо понимать, что терминология изобретения используется только для описания частных примеров осуществления изобретения и не ограничивает объем настоящего изобретения. Объем настоящего изобретения ограничен лишь пунктами формулы изобретения. Следует отметить, что используемые в настоящем документе и в приложенных формулах формы единственного числа подразумевают множественное число, если контекстом не подразумевается иное. Так, например, «вектор» может означать один или более векторов, а также их эквиваленты, известные специалистам. Термин «приблизительно» в настоящем документе означает «около», «ориентировочно», «приблизённо» или «в области». Когда термин «приблизительно» используется в отношении числового диапазона, границы этого диапазона расширены выше и ниже указанных числовых значений. В целом, термин «приблизительно» в настоящем документе означает вариацию указанного числового значения на 20 процентов (в сторону увеличения или уменьшения), предпочтительно на 10 процентов (в сторону увеличения или уменьшения). При использовании по тексту настоящего документа термин «или» означает «любой из указанного перечня», а также любую комбинацию элементов этого списка. Термины «содержать» и «содержащий», «включать», «включающий» а также их грамматические варианты при использовании в настоящем описании и в формуле изобретения указывают на присутствие одного или нескольких заявленных свойств, целых чисел, компонентов или этапов, при этом использование таких терминов означает, что дополнительно также могут присутствовать одно или несколько других свойств, целых чисел, этапов, компонентов или их групп. Во избежание неопределенности, некоторые термины в настоящем описании используются в следующих значениях:

Антипараллельный: Термин «антипараллельный» в настоящем документе относится к двум нуклеотидным последовательностям, соединенным посредством водородных связей между комплементарными остатками оснований с фосфодиэфирными связями, идущими в направлении 5'-3' в одной нуклеотидной последовательности и в направлении 3'-5' в другой нуклеотидной последовательности.

Антисмысловой: Термин «антисмысловой» относится к нуклеотидной последовательности, которая инвертирована относительно своей нормальной ориентации для транскрипции или функции и в связи с этим экспрессирует транскрипт РНК, комплементарный по отношению к молекуле мРНК целевого гена, экспрессируемой в клетке-хозяине (например, она может гибридизоваться с молекулой мРНК целевого гена или одноцепочечной геномной ДНК посредством спаривания оснований Уотсона-Крика), или которая комплементарна целевой молекуле ДНК, такой как, например, геномная ДНК, присутствующая в клетке-хозяине.

Кодирующая область: При использовании по тексту настоящего документа термин «кодирующая область» применительно к структурному гену относится к нуклеотидным последовательностям, которые кодируют аминокислоты в растущем полипептиде в результате трансляции молекулы мРНК. Кодирующая область ограничена у эукариотов с 5'-стороны триплетом нуклеотидов «ATG», который кодирует иницирующий метионин, а с 3'-стороны одним из трех триплетов, которые определяют стоп-кодона (т.е. TAA, TAG, TGA). Кроме содержащих интроны, геномные формы гена могут включать последовательности, расположенные как на 5'-, так и на 3'-конце последовательностей, присутствующих в транскрипте РНК. Эти последовательности называются «фланкирующими» последовательностями или областями (такие фланкирующие последовательности расположены на 5'- или 3'-конце от нетранслируемых последовательностей, присутствующих в транскрипте мРНК). 5'-фланкирующая область может содержать регуляторные последовательности, такие как промоторы и энхансеры, которые контролируют транскрипцию гена или влияют на нее. 3'-фланкирующая область может содержать последовательности, которые управляют терминацией транскрипции, посттранскрипционным расщеплением и полиаденилированием.

Комплементарный: Термин «комплементарный» или «комплементарность» относится к двум нуклеотидным последовательностям, которые содержат антипараллельные нуклеотидные последовательности, способные спариваться друг с другом (по правилам спаривания оснований) при образовании водородных связей между комплементарными остатками оснований в антипараллельных нуклеотидных последовательностях. Например, последовательность 5'-AGT-3' комплементарна последовательности 5'-ACT-3'. Комплементарность может быть «частичной» или «полной». «Частичная» комплементарность – это когда одно или несколько оснований нуклеиновой кислоты не совпадают в соответствии с правилами спаривания оснований. «Полная» комплементарность между молекулами нуклеиновой кислоты – это когда все основания нуклеиновой кислоты располагаются относительно других оснований в соответствии с правилами спаривания оснований. Степень комплементарности цепочек молекул нуклеиновых кислот имеет значительное влияние на эффективность и силу гибридизации цепочек молекул нуклеиновых кислот. При использовании по тексту настоящего документа термин «комплементарная нуклеотидная последовательность» относится к нуклеотидной последовательности, которая демонстрирует полную комплементарность другой нуклеотидной последовательности.

Донорная молекула ДНК: При использовании по тексту настоящего документа термины «донорная молекула ДНК», «репарационная молекула ДНК» или «матричная молекула ДНК», которые применяются в нем взаимозаменяемо, означают молекулу ДНК, имеющую последовательность, которая должна быть введена в геном клетки. К ней на 5'- и/или 3'-конце могут примыкать последовательности, гомологичные или идентичные последовательностям в целевой области генома указанной клетки. Она может содержать последовательности, которые обычно не встречаются в соответствующей клетке, такие как ОРС, некодирующие РНК или регуляторные элементы, которые должны вводиться в целевую область, или же она может содержать последовательности, гомологичные целевой области, за исключением или, по меньшей мере, одной мутации, редактирования гена: Последовательность донорной молекулы ДНК может быть добавлена к геному или может заменить последовательность в геноме, длина которой равна длине последовательности донорной ДНК.

Двухцепочечная РНК: Молекула «двухцепочечной РНК» или молекула «дцРНК» содержит смысловой РНК-фрагмент нуклеотидной последовательности и антисмысловой РНК-фрагмент нуклеотидной последовательности, которые оба содержат нуклеотидные последовательности, комплементарные по отношению друг к другу, что позволяет использовать смысловым и антисмысловым фрагменты РНК вступать в пару и образовывать двухцепочечную молекулу РНК.

Эндогенный: «Эндогенная» нуклеотидная последовательность означает нуклеотидную последовательность, которая присутствует в геноме нетрансформированной клетки растения.

Повышенная экспрессия: термины «повышать» и «усиливать» в отношении экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в клетке растения в настоящем документе являются взаимозаменяемыми и означают, что уровень экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в растении, части растения или клетке растения после применения способа по настоящему изобретению становится выше, чем его экспрессия в растении, части растения или клетке растения до применения этого способа или по сравнению с эталонным растением, в котором отсутствует молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Например, эталонное растение содержит тот же конструкт, в котором отсутствует только соответствующий NEENA. При использовании по тексту настоящего документа термины «усиленный» или «повышенный» являются синонимами и означают более высокую, предпочтительно значительно более высокую экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты, которая должна быть экспрессирована. При использовании по тексту настоящего документа «усиление» или «повышение» уровня агента, такого как белок, мРНК или РНК, означает, что уровень повышен по сравнению по существу с существенно идентичным растением, частью растения или клеткой растения, выращенной по существу в идентичных условиях, в которой отсутствует молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, например, в которой отсутствует молекула NEENA, рекомбинантный конструкт или рекомбинантный вектор по настоящему изобретению. При использовании по тексту настоящего документа термин «усиление» или «повышение» в отношении уровня агента, такого как, например, преРНК, мРНК, рРНК, тРНК, мякРНК, мяРНК, экспрессируемого целевым геном и/или кодируемым им белковым продуктом, означает, что уровень увеличивается

на 50% или более, например, на 100% или более, предпочтительно на 200% или более, более предпочтительно в 5 раз или более, еще более предпочтительно в 10 раз или более, наиболее предпочтительно в 20 раз или более, например, в 50 раз по сравнению с клеткой или организмом, в котором отсутствует молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по изобретению. Повышение или увеличение может определяться способами, которые известны специалистам. Таким образом, повышение или увеличение количества нуклеиновой кислоты или белка может определяться, например, путем иммунологической детекции белка. Более того, для измерения количества определенного белка или РНК в растении или клетке растения могут использоваться такие методы, как белковый анализ, флуоресцентный анализ, Нозерн-гибридизация, анализ с защитой от действия нуклеаз, обратная транскрипция (количественная ОТ-ПЦР), метод ИФА (иммуноферментный анализ), вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (РИА) или другие иммуноанализы, а также клеточный анализ с активацией флуоресценции (FACS). В зависимости от типа искусственного белкового продукта также может быть определена его активность или влияние на фенотип организма или клетки. Способы определения количества белка известны специалистам. Можно упомянуть следующие примеры: микробиуретовый метод (Goa J (1953) Scand J Clin Lab Invest 5:218-222), метод Фолина-Чокальтеу (Lowry OH et al. (1951) J Biol Chem 193:265-275) или измерение абсорбции СВВ G-250 (Bradford MM (1976) Analyt Biochem 72:248-254). В качестве одного из примеров количественного расчета активности белка в приведенных ниже примерах описано определение активности люциферазы.

Экспрессия: «Экспрессия» относится к биосинтезу продукта гена, в частности к транскрипции и/или трансляции нуклеотидной последовательности, например, эндогенного гена или гетерологичного гена, в клетке. Например, в случае структурного гена экспрессия включает транскрипцию структурного гена в мРНК и, при необходимости, последующую трансляцию мРНК в один или более полипептидов. В других случаях экспрессия может относиться только к транскрипции ДНК, кодирующей молекулу РНК.

Экспрессионный конструкт: «Экспрессионный конструкт» при использовании по тексту настоящего документа означает последовательность ДНК, способную направлять экспрессию конкретной нуклеотидной

последовательности в соответствующей части растения или клетки растения, содержащей промотор, функциональный в указанной части или клетке растения, в которую она будет введена, функционально связанный с интересующей нуклеотидной последовательностью, которая, при необходимости, функционально связана с сигналами терминации. Если требуется трансляция, она также обычно включает последовательности, необходимые для правильной трансляции нуклеотидной последовательности. Кодированная область может кодировать представляющий интерес белок, но при этом также может кодировать представляющую интерес функциональную РНК, например, РНКа, миРНК, мякРНК, мяРНК, микроРНК, та-миРНК или любую другую некодирующую регуляторную РНК в смысловом или антисмысловом направлении. Экспрессионный конструкт, содержащий интересующую нуклеотидную последовательность, может быть химерным, что означает, что один или более его компонентов являются гетерологичными по отношению к одному или нескольким другим его компонентам. Экспрессионный конструкт также может быть естественным, но полученным в рекомбинантной форме, подходящей для гетерологичной экспрессии. Однако, как правило, экспрессионный конструкт является гетерологичным по отношению к хозяину, т.е. конкретная последовательность ДНК экспрессионного конструкта в естественном виде не встречается в клетке-хозяине и должна быть введена в клетку-хозяин или предку клетки-хозяина посредством трансформационного события. Экспрессия нуклеотидной последовательности в экспрессионном конструкте может находиться под контролем конститутивного промотора или индуцируемого промотора, который инициирует транскрипцию только тогда, когда клетка-хозяин подвержена воздействию какого-либо конкретного внешнего стимула. В случае с растением промотор также может быть специфичным для конкретной ткани или органа, или стадии развития.

Чужеродный: Термин «чужеродный» относится к любой молекуле нуклеиновой кислоты (например, к геновой последовательности), которая введена в геном клетки путем экспериментальных модификаций, и может включать природные последовательности, при условии, что введенная последовательность содержит некоторую модификацию (например, точечную мутацию, наличие

селектируемого маркерного гена и т.д.) и поэтому отличается от природной последовательности.

Функциональная связь: Термины «функциональная связь» или «функционально связанный» означают, например, последовательное расположение регуляторного элемента (например, промотора) с нуклеотидной последовательностью, которая экспрессируется, и, при необходимости, дополнительных регуляторных элементов (таких как, например, терминатор или NEENA) таким образом, чтобы каждый из регуляторных элементов мог выполнять соответствующую функцию, для экспрессии, модификации экспрессии, стимуляции экспрессии или влияния иным образом на экспрессию указанной нуклеотидной последовательности. Выражение «оперативная связь» или «оперативно связанный» является синонимичным. В результате этого, экспрессия может быть зависимой от расположения нуклеотидных последовательностей по отношению к смысловой или антисмысловой РНК. Для этого не обязательно требуется прямая связь в химическом смысле. Кроме того, воздействие на целевую последовательность могут оказывать последовательности для генетического регулирования, такие как, например, энхансерные последовательности, из положений, которые находятся дальше от других молекул ДНК. Предпочтительными являются расположения, при которых нуклеотидная последовательность, подлежащая рекомбинантной экспрессии, расположена позади последовательности, выступающей в качестве промотора, так что две последовательности ковалентно связаны друг с другом. Расстояние между последовательностью промотора и последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей рекомбинантной экспрессии, предпочтительно составляет менее 200 пар оснований, особенно предпочтительно менее 100 пар оснований, наиболее предпочтительно менее 50 пар оснований. В предпочтительном варианте осуществления транскрибируемая нуклеотидная последовательность расположена за промотором таким образом, что начало транскрипции идентично целевому началу химерной РНК по изобретению. Функциональная связь и экспрессионный конструкт могут быть получены с помощью обычных методов рекомбинации и клонирования, как описано (например, в Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-ое Изд., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY); Silhavy et al. (1984) *Experiments with Gene*

Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY); Ausubel et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience; Gelvin et al. (Eds) (1990) Plant Molecular Biology Manual; Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Нидерланды). Тем не менее, между двумя последовательностями также могут быть расположены дополнительные последовательности, которые, например, действуют в качестве линкера со специфическими сайтами расщепления для рестрикционных ферментов или в качестве сигнального пептида. Вставка последовательностей также может приводить к экспрессии белков слияния. Предпочтительно, экспрессионная конструкция, состоящий из связи регуляторной области, например, промотора и экспрессируемой нуклеотидной последовательности, может присутствовать в форме, интегрированной с вектором, или может быть введен в геном растения, например, путем трансформации.

Ген: Термин «ген» относится к области, функционально присоединенной к соответствующим регуляторным последовательностям, способным каким-либо образом регулировать экспрессию генного продукта (например, полипептида или функциональной РНК). Ген включает нетранслируемые регуляторные области ДНК (например, промоторы, энхансеры, репрессоры и т.д.), которые расположены перед (против хода транскрипции) или после (по ходу транскрипции) кодирующей областью (открытая рамка считывания, ОРС), а также, где применимо, промежуточные последовательности (т.е. интроны) между отдельными кодирующими областями (т.е. экзоны). При использовании по тексту настоящего документа термин «структурный ген» означает последовательность ДНК, которая транскрибируется в мРНК, которая затем транслируется в последовательность аминокислот, характерную для определенного полипептида.

«Редактирование гена» при использовании в настоящем документе означает введение конкретной мутации в определенную позицию в геноме клетки. Редактирование гена может быть производиться путем точного редактирования с использованием более продвинутых технологий, например, с применением системы CRISPR-Cas и донорной ДНК или системы CRISPR-Cas, связанной с мутагенной активностью, такой как деаминаза (WO15133554, WO17070632).

Геном и геномная ДНК: Термины «геном» или «геномная ДНК» относятся к наследуемой генетической информации организма-хозяина. Указанная геномная

ДНК включает ДНК ядра (также называемую хромосомной ДНК), а также ДНК пластид (например, хлоропластов) и других клеточных органелл (например, митохондрий). Предпочтительно, термины «геном» или «геномная ДНК» относятся к хромосомной ДНК ядра.

Гетерологичный: Термин «гетерологичный» по отношению к молекуле нуклеиновой кислоты или ДНК относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая функционально связана со второй молекулой нуклеиновой кислоты, например, с промотором, с которой она функционально не связана в природе, например, в геноме растения дикого типа, или с которой она оперативно связана в природе, но в другом месте или в другой позиции, например, в геноме растения дикого типа.

Предпочтительно, термин «гетерологичный» по отношению к молекуле нуклеиновой кислоты или ДНК, например, NEENA, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая функционально связана или после манипуляций будет функционально связана со второй молекулой нуклеиновой кислоты, например, с промотором, с которым она функционально не связана в природе.

Гетерологичная экспрессионная конструкция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты и одну или несколько связанных с ней регуляторных молекул нуклеиновой кислоты (например, промотор или сигнал терминации транскрипции), например, представляет собой конструкцию, полученную в результате экспериментальных модификаций, при которых а) указанная молекула нуклеиновой кислоты, или б) указанная регуляторная молекула нуклеиновой кислоты или с) обе эти последовательности по пп. а) и б) расположены вне в природной (нативной) генетической среде или подверглись модификации, примером такой модификации является замена, добавление, удаление, инверсия или вставка одного или нескольких нуклеотидных остатков. Под «естественной генетической средой» понимают естественный хромосомный локус в исходном организме или внутри организма-хозяина или нахождение в геномной библиотеке. В случае геномной библиотеки, естественная генетическая среда нуклеотидной последовательности предпочтительно сохраняется, по меньшей мере, частично. Среда примыкает к нуклеотидной последовательности, по меньшей мере, с одной стороны и имеет последовательность длиной, по меньшей мере, 50 п.о., предпочтительно, по меньшей мере, 500 п.о., особенно предпочтительно, по

меньшей мере, 1.000 п.о. и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 5.000 п.о. Природная экспрессионная конструкция – например, природная комбинация промотора с соответствующим геном – становится трансгенной экспрессионной конструкцией, когда она изменяется с помощью не природных, синтетических («искусственных») методов, таких как, например, мутагенная обработка. Эти методы описаны в литературе (US 5,565,350; WO 00/15815). Например, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, функционально связанная с промотором, которая не является нативным промотором этой молекулы, считается гетерологичной по отношению к промотору. Предпочтительно, гетерологичная ДНК не является эндогенной по отношению к клетке, в которую она введена, или не связана с ней естественным образом, но была получена из другой клетки или получена синтетическим путем. Гетерологичная ДНК также включает эндогенную последовательность ДНК, которая содержит некоторую модификацию, не встречающуюся в природе, множественные копии эндогенной последовательности ДНК или последовательность ДНК, физически связанную с другой последовательностью ДНК, которая в природе с ней не связана. Как правило, но не всегда, гетерологичная ДНК кодирует РНК или белки, которые обычно не продуцируются клеткой, в которой она экспрессируется.

Промотор с повышенной экспрессией: При использовании по тексту настоящего документа «промотор с повышенной экспрессией» означает промотор, вызывающий экспрессию в растении или его части, отличающийся тем, что накопление или скорость синтеза РНК или стабильность РНК, полученной из молекулы нуклеиновой кислоты под контролем соответствующего промотора, выше, предпочтительно значительно выше, чем экспрессия, вызванная промотором, не содержащим NEENA по изобретению. Предпочтительно, количество РНК и/или скорость синтеза РНК и/или стабильность РНК увеличивают на 50% или более, например, на 100% или более, предпочтительно на 200% или более, более предпочтительно в 5 раз или более, еще более предпочтительно в 10 раз или более, наиболее предпочтительно в 20 раз или более, например, в 50 раз по сравнению с промотором, не содержащим NEENA по изобретению.

Гибридизация: Термин «гибридизация» согласно определению в настоящем документе относится к процессу, при котором в значительной степени комплементарные нуклеотидные последовательности гибридизируются друг с

другом. Процесс гибридизации может полностью происходить в растворе, т.е. обе комплементарные нуклеиновые кислоты находятся в растворе. Также процесс может проходить с участием одной из комплементарных нуклеиновых кислот, иммобилизованных в матрице, такой как магнитные гранулы, гранулы сефарозы или любой другой смолы. Процесс гибридизации, кроме того, может быть осуществлен с одной из комплементарных нуклеиновых кислот, иммобилизованной в твердой подложке, такой как нитроцеллюлоза или нейлоновая мембрана, или иммобилизованной, например, путем фотолитографии, например, на кремнийсодержащей стеклянной подложке (последние известны как нуклеиновокислотные матрицы или микроматрицы или как нуклеиновокислотные чипы). Для того чтобы осуществить возможную гибридизацию, молекулы нуклеиновой кислоты обычно термически или химически денатурируют, чтобы перевести двойную цепь в две единичные цепи и/или удалить «шпильки» или другие вторичные структуры из единичных цепных нуклеиновых кислот.

Термин «жесткость» относится к условиям, в которых протекает гибридизация. К таким условиям относятся температура, концентрация соли, ионная сила или состав буфера гибридизации. Обычно выбирают следующие условия с низкой жесткостью: 30°C ниже точки плавления (T_m) для определенной последовательности при определенной ионной силе и pH. Условия средней жесткости – 20°C ниже T_m , высокой жесткости – 10°C ниже T_m . Жесткие условия гибридизации обычно используют для выделения гибридизирующих последовательностей, которые имеют высокую степень идентичности с целевыми нуклеотидными последовательностями. Тем не менее, аминокислоты могут отклоняться в последовательности и все еще кодировать в значительной степени подобный полипептид вследствие вырожденности генетического кода. Поэтому для определения таких молекул аминокислот иногда могут быть необходимы условия средней жесткости.

T_m – это температура (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% целевой последовательности гибридизирует с подобранным зондом. T_m зависит от состояния раствора, состава оснований и длины зонда. Например, более длинные последовательности гибридизируют при более высокой температурах. С наибольшей скоростью гибридизация происходит при температуре приблизительно от 16°C до 32°C ниже T_m . Наличие одновалентных катионов в

растворе гибридизации уменьшает электростатическое отталкивание между двумя цепочками аминокислот, тем самым способствуя гибриднему образованию; данный эффект наблюдается при концентрациях натрия до 0,4 М (при более высоких концентрациях им можно пренебречь). Формамид уменьшает температуру плавления двойных спиралей ДНК-ДНК и ДНК-РНК на 0,6 – 0,7°C на каждый процент формамида, а добавление 50% формамида позволяет осуществить гибридизацию при 30 – 45°C, хотя скорость гибридизации будет ниже. Несоответствия пар оснований снижают скорость гибридизации и термальную стабильность двойных спиралей. В среднем и для больших зондов, T_m снижается на приблизительно 1°C на % несоответствия основания. T_m можно рассчитать по следующим формулам, в зависимости от типа гибрида:

Гибриды ДНК-ДНК (Meinkoth and Wahl, Anal. Biochem., 138: 267-284, 1984):

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 \times \log[\text{Na}^+]_a + 0,41 \times \%[\text{G/Cb}] - 500 \times [\text{Lc}]^{-1} - 0,61 \times \% \text{ формамид}$$

Гибриды ДНК-РНК или РНК-РНК:

$$T_m = 79,8 + 18,5 (\log_{10}[\text{Na}^+]_a) + 0,58 (\% \text{G/Cb}) + 11,8 (\% \text{G/Cb})^2 - 820/\text{Lc}$$

Гибриды олиго-ДНК или олиго-РНКd:

$$\text{Для } < 20 \text{ нуклеотидов: } T_m = 2 (\ln)$$

$$\text{Для } 20 - 35 \text{ нуклеотидов: } T_m = 22 + 1,46 (\ln)$$

a либо для другого однозарядного катиона, но только в диапазоне 0,01–0,4 М.

b только для % GC в диапазоне 30% – 75%.

c L = длина двойных спиралей в парах оснований.

d олиго, олигонуклеотид; \ln = эффективная длина праймера = $2 \times (\text{№ G/C}) + (\text{№ A/T})$.

Неспецифическое связывание может контролироваться с помощью известных технологий, например, таких как блокирование мембраны путем растворов с содержанием белка, добавление гетерологичных РНК, ДНК и SDS (додecilсульфата натрия) в буфер гибридизации, обработка рибонуклеазой. Для неродственных зондов может осуществляться серия гибридизаций путем сильного понижения температуры гибридизации (например, с 68°C до 42°C) или уменьшения концентрации формамида (например, с 50% до 0%). Специалисту известны различные параметры, которые могут изменяться во время гибридизации и которые помогут сохранить или изменить условия жесткости.

Помимо условий гибридизации, специфичность гибридизации зависит также от функции промывки после гибридизации. Чтобы убрать фон после

неспецифичной гибридизации, образцы промывают в разбавленных соляных растворах. Решающие факторы промывки включают ионическую силу и температуру последнего раствора: чем более низкая концентрация соли и более высокая температура, тем выше жесткость условий промывки. Промывка обычно проводится при условиях той же жесткости, что и условия гибридизации, либо при условиях более низкой жесткости. Положительная гибридизация дает сигнал, который, по меньшей мере, в два раза превосходит фон. Обычно соответствующие жесткие условия для анализа гибридизации нуклеиновых кислот или процедур по определению амплификации генов такие же, как изложены выше. Могут быть также выбраны более или менее жесткие условия. Хорошему специалисту известны различные параметры, которые можно изменить во время промывки и которые помогут сохранить или изменить условия напряженности.

Например, условия высокой жесткости гибридизации для гибридов ДНК, длиной более 50 нуклеотидов, включают гибридизацию при 65°C в 1 x SSC или при 42°C в 1x SSC и 50% формамида, затем промывка при 65°C в 0,3x SSC. Условия гибридизации средней жесткости для гибридов ДНК длиной более 50 нуклеотидов, включают гибридизацию при температуре 50° C в 4x SSC или при 40° C в 6 x SSC и 50% формамида, затем промывку при 50° C в 2x SSC. Длина гибрида – это предполагаемая длина гибридизируемой нуклеиновой кислоты. Когда нуклеиновые кислоты известной последовательности гибридизируются, длина гибрида определяется путем выравнивания последовательностей и определения консервативных областей, описание которых приводится в настоящем документе. 1 × SSC – 0,15 M NaCl, 15 mM цитрат тринатрия, растворы гибридизации и промывки могут также включать 5 × раствор Денхардта, 0,5 - 1,0 % SDS, 100 мкг/мл денатурированной фрагментированной ДНК-носителя, 0,5% пиррофосфат натрия. Еще один пример условий высокой жесткости – гибридизация при 65°C в растворе 0,1x SSC, содержащем 0,1 SDS и, при необходимости, 5x раствора Денхардта, 100 мкг/мл денатурированной, фрагментированной ДНК из молок лососёвых, 0,5% пиррофосфата натрия, с последующей промывкой при 65°C в 0,3x SSC.

Для определения уровня жесткости условий, можно обратиться к работе Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, New York или к *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989 и ежегодные обновления).

«Идентичность»: «Идентичность» в отношении сравнения двух или более молекул нуклеиновой кислоты или аминокислоты означает, что последовательности указанных молекул имеют определенную степень сходства последовательностей, причем последовательности частично идентичны.

Варианты ферментов можно определить по идентичности их последовательностей по сравнению с исходным ферментом. Степень идентичности последовательностей обычно указывается как «процент идентичности последовательности» или «процент идентичности». Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей на первом этапе производится попарное выравнивание этих двух последовательностей, при этом две последовательности выравниваются по их полной длине (то есть попарное глобальное выравнивание). Выравнивание осуществляется с помощью программы, реализующей алгоритм Нидлмана-Вунша (J. Mol. Biol. (1979) 48, стр. 443-453), предпочтительно с помощью программы «NEEDLE» (The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS)) с параметрами программы по умолчанию (штраф на внесение гэпа = 10,0, штраф за продолжение гэпа = 0,5 и матрица EBLOSUM62). Для целей настоящего изобретения предпочтительным выравниванием является такое выравнивание, при котором может быть определена наибольшая идентичность последовательностей.

В следующем примере для иллюстрации приводятся две нуклеотидных последовательности, но те же вычисления применимы и к белковым последовательностям:

Seq A: AAGATACTG длина: 9 оснований

Seq B: GATCTGA длина: 7 оснований

Таким образом, более короткая последовательность – это последовательность B.

Попарное глобальное выравнивание обеих последовательностей по полной длине дает следующее:

Seq A: AAGATACTG-

||| |||

Seq B: --GAT-CTGA

Символ «|» в выравнивании указывает на идентичные остатки (основания для ДНК или аминокислоты для белков). Количество идентичных остатков равно 6.

Символ «-» в выравнивании указывает на гэпы. Количество гэпов, вносимых при выравнивании в последовательность В, составляет 1. Количество гэпов, вносимых при выравнивании в пограничный район последовательности В, составляет 2, а в пограничный район последовательности А – 1.

Длина участка выравнивания, показывающая выровненные последовательности по всей их длине, составляет 10.

Получение участка попарного выравнивания, который показывает более короткую последовательность по всей его длине в соответствии с изобретением, следовательно, приводит к:

Seq A: GATACTG-

||| |||

Seq B: GAT-CTGA

Получение участка попарного выравнивания, который показывает последовательность А по всей его длине в соответствии с изобретением, следовательно, приводит к:

Seq A: AAGATACTG

||| |||

Seq B: --GAT-CTG

Получение участка попарного выравнивания, который показывает последовательность В по всей его длине в соответствии с изобретением, следовательно, приводит к:

Seq A: GATACTG-

||| |||

Seq B: GAT-CTGA

Длина выравнивания, показывающая более короткую последовательность по всей ее длине, равна 8 (присутствует один гэп, который учитывается в длине выравнивания более короткой последовательности).

Соответственно, длина выравнивания, показывающая последовательность А по всей его длине, будет равна 9 (что означает, что последовательностью по изобретению является последовательность А).

Соответственно, длина выравнивания, показывающая последовательность В по всей его длине, будет равна 8 (что означает, что последовательностью по изобретению является последовательность В).

После выравнивания двух последовательностей на втором этапе из полученного выравнивания определяется значение процента идентичности. Для целей настоящего описания процент идентичности рассчитывается по следующей формуле = (идентичные остатки/длина области выравнивания, которая показывает соответствующую последовательность данного изобретения по всей ее длине) * 100. Таким образом, в соответствии с этим вариантом реализации идентичность последовательности при сравнении двух аминокислотных последовательностей вычисляется путем деления количества идентичных остатков на длину области выравнивания, которая показывает соответствующую последовательность данного изобретения по всей ее длине. Для получения процента идентичности это значение умножается на 100. Согласно примеру, приведенному выше, процент идентичность составляет: для последовательности А, являющейся последовательностью по изобретению $(6/9) * 100 = 66,7 \%$; последовательности В, являющейся последовательностью по изобретению $(6/8) * 100 = 75\%$.

Инсерционно-делеционная мутация – это термин, обозначающий случайную вставку или делецию оснований в геноме организма, которые связаны с репарацией разрыва двухцепочечной ДНК с помощью негомологичного соединения концов. Он относится к небольшим генетическим вариациям, имеющим длину от 1 до 10 000 пар оснований. При использовании по тексту настоящего документа термин относится к случайной вставке или удалению оснований в целевом сайте или в непосредственной близости (например, менее чем 1000 п.о., 900 п.о., 800 п.о., 700 п.о., 600 п.о., 500 п.о., 400 п.о., 300 п.о., 250 п.о., 200 п.о., 150 п.о., 100 п.о., 50 п.о., 40 п.о., 30 п.о., 25 п.о., 20 п.о., 15 п.о., 10 п.о. или 5 п.о. до и/или после) к целевому сайту.

Термин «введение» и т.п. в отношении введения молекулы донорной ДНК в целевой сайт-мишень целевой ДНК означает любое введение последовательности молекулы донорной ДНК в целевую область, например, путем физического встраивания молекулы донорной ДНК или ее части в целевую область, или введение последовательности молекулы донорной ДНК или ее части в целевую область, и при этом донорная ДНК используется в качестве матрицы для полимеразы.

Интрон: относится к участкам ДНК (вставочным последовательностям) внутри гена, которые не кодируют часть белка, производимого геном, и который сплайсируются из мРНК, транскрибируемой из гена до того, как она экспортируется из ядра клетки. Последовательность интрона относится к нуклеотидной последовательности интрона. Таким образом, интроны представляют собой те участки последовательностей ДНК, которые транскрибируются вместе с кодирующей последовательностью (экзонами), но удаляются при образовании зрелой мРНК. Интроны могут располагаться внутри фактической кодирующей области или в 5'- или 3'-нетранслируемых лидерах пре-мРНК (несплайсированная мРНК). Интроны в первичном транскрипте вырезаются, а кодирующие последовательности одновременно и точно лигируются с образованием зрелой мРНК. Стыки интронов и экзонов образуют сайт сплайсинга. Последовательность интрона начинается с GU и заканчивается AG. Кроме того, в растениях было описано два примера интронов AU-AC: четырнадцатый интрон гена RecA-подобного белка и седьмой интрон гена G5 из *Arabidopsis thaliana* представляют собой интроны AT-AC. В пре-мРНК, содержащих интроны, имеется три коротких последовательности, которые, помимо других последовательностей, имеют важнейшее значение для точного сплайсинга интрона. Эти последовательности представляют собой 5'-сайт сплайсинга, 3'-сайт сплайсинга и точку ветвления. Сплайсинг мРНК представляет собой удаление вставочных последовательностей (интронов), присутствующих в первичных транскриптах мРНК, а также объединение или лигирование последовательностей экзонов. Это также известно как цис-сплайсинг, при котором происходит соединение двух экзонов одной и той же РНК с удалением вставочной последовательности (интрона). Функциональные элементы интрона включают последовательности, которые распознаются и связываются со специфическими белковыми компонентами сплайсосомы (например, консенсусные последовательности сплайсинга на концах интронов). Взаимодействие функциональных элементов со сплайсосомой приводит к удалению интронной последовательности из преждевременной мРНК и повторному соединению экзонных последовательностей. Интроны имеют три короткие последовательности, которые необходимы, хотя и недостаточны, для точного сплайсинга интрона. Эти последовательности представлены 5'-сайтом сплайсинга, 3'-сайтом сплайсинга и точкой ветвления. Последовательность точки ветвления имеет важное значение для

сплайсинга и выбора сайта сплайсинга у растений. Последовательность точки ветвления обычно расположена на участке 10 - 60 нуклеотидов ранее 3'-сайта сплайсинга.

Изогенный: организмы (например, растения), которые генетически идентичны, за исключением того, что они могут отличаться наличием или отсутствием гетерологичной последовательности ДНК.

Выделенный: При использовании по тексту настоящего документа термин «выделенный» означает, что материал был изъят человеком из своей исходной естественной среды и существует отдельно от нее, и, следовательно, не является природным продуктом. Выделенный материал или молекула (например, молекула ДНК или фермент) могут существовать в очищенной форме или может существовать в неприродной среде, например, в трансгенной клетке-хозяине. Например, природный полинуклеотид или полипептид, присутствующие в живом растении, не являются выделенными, а выделенными являются тот же самый полинуклеотид или полипептид, отделенные от некоторых или всех материалов, находящихся вместе с ними в природной системе. Такие полинуклеотиды могут быть частью вектора, и/или такие полинуклеотиды или полипептиды могут быть частью композиции, и являются выделенными, если такой вектор или композиция не являются частью исходного окружения такой молекулы. Предпочтительно, термин «выделенный», когда он используется в отношении молекулы нуклеиновой кислоты, например, «выделенная последовательность нуклеиновой кислоты», относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена, по меньшей мере, от одной посторонней молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в природе. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты – это молекула нуклеиновой кислоты, присутствующая в такой форме или в такой окружающей среде, которые отличаются от формы или от окружающей среды, в которой эта молекула встречается в природе. Напротив, невыделенные молекулы нуклеиновых кислот представляют собой молекулы нуклеиновых кислот, такие как ДНК и РНК, которые находятся в том же окружении, в котором они существуют в природе. Например, определенная последовательность ДНК (например, ген) находится на хромосоме клетки-хозяина в непосредственной близости от соседних генов; последовательности РНК, такие как определенная последовательность мРНК, кодирующая определенный белок,

обнаруживаются в клетке в виде смеси с множеством других мРНК, которые кодируют множество белков. Тем не менее, выделенная нуклеотидная последовательность, содержащая, например, последовательность SEQ ID NO: 1 включает, например, такие последовательности нуклеиновой кислоты в клетках, которые обычно содержат SEQ ID NO:1, которые находятся в таком положении в хромосоме или вне хромосомы, которое отличается от такого положения в природных клетках или иным образом фланкированы нуклеотидной последовательностью, которая отличается от природной. Выделенная нуклеотидная последовательность может присутствовать в одноцепочечном или в двухцепочечном виде. Если выделенная нуклеотидная последовательность должна использоваться для экспрессии белка, эта нуклеотидная последовательность должна, по меньшей мере, часть смысловой или кодирующей цепи (т.е. такая нуклеотидная последовательность может быть одноцепочечной). В альтернативном варианте она может содержать как смысловую, так и антисмысловую цепь (т.е. последовательность нуклеиновой кислоты может быть двухцепочечной).

Минимальный промотор: элементы промотора, особенно элемент ТАТА, которые являются неактивными или имеют значительно сниженную промоторную активность в отсутствие предшествующей активации. В присутствии подходящего транскрипционного фактора минимальные функции промотора обеспечивают возможность транскрипции.

Некодирующий: Термин «некодирующий» относится к молекулам нуклеиновых кислот, которые не кодируют часть или весь экспрессируемый белок. Некодирующие последовательности включают, помимо прочего, интроны, энхансеры, промоторные области, 3'-нетранслируемые области и 5'-нетранслируемые области.

Нуклеиновая кислота, усиливающая экспрессию нуклеиновой кислоты (NEENA): Термин «нуклеиновая кислота, усиливающая экспрессию нуклеиновой кислоты» относится к последовательности и/или молекуле нуклеиновой кислоты определенной последовательности, обладающей внутренним свойством усиливать экспрессию нуклеиновой кислоты под контролем промотора, к которому функционально привязана NEENA. В отличие от промоторных последовательностей, NEENA сама по себе не способна стимулировать

экспрессию. Чтобы выполнять функцию усиления экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, функционально связанной с NEENA, сама NEENA должна быть функционально привязана к промотору. В отличие от энхансерных последовательностей, известных специалистам в данной области, NEENA действует в цис-, а не в транс-позиции, и для экспрессии должна быть расположена близко к сайту начала транскрипции нуклеиновой кислоты.

Нуклеиновые кислоты и нуклеотиды: Термины «нуклеиновые кислоты» и «нуклеотиды» относятся к природным, синтетическим или искусственным нуклеиновым кислотам, или нуклеотидам. Термины «нуклеиновые кислоты» и «нуклеотиды» включают дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды или аналоги любого нуклеотида и их полимеры или гибриды в одно- или двухцепочечной, смысловой или антисмысловой форме. За исключением случаев, когда указано иное, подразумевается, что определенная нуклеотидная последовательность также потенциально включает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также напрямую указанные последовательности. Термин «нуклеиновая кислота» в настоящем документе используется взаимозаменяемо с терминами «ген», «кДНК», «мРНК», «олигонуклеотид» и «полинуклеотид». Аналоги нуклеотидов включают нуклеотиды с модификациями в химической структуре основания, сахара и/или фосфата, в том числе, помимо прочего, модификации пиримидина в положении 5, модификации пурина в положении 8, модификации экзоциклических аминов цитозина, замещение 5-бромо-урацила и подобных групп; и модификации сахара в положении 2, в том числе, помимо прочего, рибонуклеотиды, модифицированные сахаром, в которых 2'-ОН заменен группой, выбранной из H, OR, R, галогена, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ или CN. Короткие шпильчатые РНК (кшРНК) также могут содержать неприродные элементы, такие как неприродные основания, например, иозин и ксантин, неприродные сахара, например, 2'-метоксирибозу, или неприродные фосфодиэфирные связи, например, метилфосфонаты, фосфоротиоаты и пептиды.

Нуклеотидная последовательность: Термин «нуклеотидная последовательность» относится к одно- или двухцепочечному полимеру дезоксирибонуклеотидных или рибонуклеотидных оснований, считываемых,

начиная с 5'- к 3'-конца. Он включает хромосомную ДНК, самореплицирующиеся плазмиды, инфекционные полимеры ДНК или РНК и ДНК или РНК, которые играют главным образом структурную роль. «Нуклеотидная последовательность» также относится к последовательному списку сокращений, букв, символов или слов, которые означают нуклеотиды. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота может являться зондом, который представляет собой относительно короткую нуклеиновую кислоту, обычно длиной менее 100 нуклеотидов. Зачастую зонд на основе нуклеиновой кислоты имеет длину приблизительно от 50 нуклеотидов до приблизительно 10 нуклеотидов. «Целевая область» нуклеиновой кислоты – представляющая интерес часть нуклеиновой кислоты. «Кодирующая область» нуклеиновой кислоты представляет собой часть нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется и транслируется последовательно-специфическим образом с получением определенного полипептида или белка под контролем соответствующих регуляторных последовательностей. Таким образом, кодирующая область кодирует такой полипептид или белок.

Олигонуклеотид. Термин «олигонуклеотид» относится к олигомеру или полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или их миметикам, а также к олигонуклеотидам, имеющим не встречающиеся в природе части, которые функционируют схожим образом. Такие модифицированные или замещенные олигонуклеотиды часто предпочтительнее нативных форм из-за целевых свойств, таких как, например, повышенный клеточный захват, повышенное сродство к целевой нуклеиновой кислоте и повышенная стабильность в присутствии нуклеаз. Олигонуклеотид предпочтительно включает два или более нуклеомомера, ковалентно соединенных друг с другом связями (например, фосфодиэфирами) или замещающими связями.

Липкий конец: «Липкий конец» – это относительно короткая одноцепочечная нуклеотидная последовательность на 5'- или 3'-гидроксильном конце двухцепочечной олигонуклеотидной молекулы (которая также может именоваться «выступающим концом»).

Растение: обычно под ним понимается любой эукариотический одно- или многоклеточный организм или его клетка, ткань, орган, часть или материал для

размножения (например, семена или плоды), способные к фотосинтезу. Для целей изобретения сюда включены все роды и виды высших и низших растений царства растений. Предпочтительны это однолетние, многолетние, однодольные и двудольные растения. Этот термин включает зрелые растения, семена, побеги и сеянцы и их производные части, материал для размножения (такой как семена или микроспоры), органы растений, ткани, протопласты, каллюсы и другие культуры, например, клеточные культуры и любые другие типы групп клеток растений для получения функциональных или структурных единиц. Зрелые растения относятся к растениям на любой желаемой стадии развития после стадии сеянца. Сеянец представляет собой молодое незрелое растение на ранней стадии развития. Предпочтительными организмами-хозяевами для получения трансгенных растений являются однолетние, двулетние, однодольные и двудольные растения. Кроме того, экспрессия генов выгодна во всех декоративных растениях, полезных или декоративных деревьях, цветах, срезанных цветах, кустарниках или газонах. Растения, которые можно привести в качестве примера, но не в качестве ограничения, включают покрытосеменные растения, мохообразные, такие как, например, *Hepaticae* (печеночники) и *Musci* (мхи); папоротникообразные, такие как папоротники, хвощи и плауны; голосеменные, такие как хвойные деревья, саговники, гинкго и гнетовидные; водоросли, такие как *Chlorophyceae*, *Phaeophyceae*, *Rhodophyceae*, *Muchophyceae*, *Xanthophyceae*, *Bacillariophyceae* (диатомовые водоросли) и *Euglenophyceae*. Предпочтительными являются растения, которые используются в пищу или для корма, такие как семейство бобовых, такие как горох, люцерна и соя; злаки, такие как рис, кукуруза, пшеница, ячмень, сорго, просо, рожь, тритикале или овес; семейство зонтичных, особенно род *Daucus*, особенно виды *carota* (морковь) и *Apium*, особенно виды *Graveolens dulce* (сельдерей) и многие другие; семейство *Solanaceae*, особенно род *Lycopersicon*, особенно виды *esculentum* (томаты) и рода *Solanum*, особенно виды *tuberosum* (картофель) и *melongena* (баклажаны), и многие другие (например, табак); и род *Capsicum*, особенно вид *annuum* (перец) и многие другие; семейство *Leguminosae*, особенно род *Glycine*, особенно виды *max* (соя), люцерна, горох, люцерна, бобы или арахис и многие другие; и семейство крестоцветных (*Brassicaceae*), особенно род *Brassica*, крайне особенно виды *rapus* (масличный рапс), *campestris* (свекла), *oleracea cv Tasti* (капуста), *oleracea cv Snowball Y* (цветная капуста) и *oleracea cv Emperor* (брокколи); и род *Arabidopsis*, крайне

особенно видов *thaliana* и многих других; семейство Compositae, особенно род *Lactuca*, особенно виды *sativa* (латук) и многие другие; семейство сложноцветных, таких как подсолнечник, бархатцы, латук или календула и многие другие; семейство Cucurbitaceae, такое как дыня, тыква/кабачок или цукини и льняное семя. Также предпочтительными являются хлопок, сахарный тростник, конопля, лен, перец чили и различные виды деревьев, орехов и вин.

Полипептид: Термины «полипептид», «пептид», «олигопептид», «полипептид», «генный продукт», «продукт экспрессии» и «белок» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимера или олигомера из следующих друг за другом аминокислотных остатков.

Предбелок: Белок, который обычно нацелен на клеточную органеллу, такую как хлоропласт, но при этом все же содержит свой транзитный пептид.

«Точный» в отношении введения молекулы донорной ДНК в целевую область означает, что последовательность донорной молекулы ДНК вводится в целевую область без каких-либо инсерционно-делеционных мутаций, дупликаций или других мутаций по сравнению с неизменной последовательностью ДНК целевой области, которые не включены в последовательность молекулы донорной ДНК.

Первичный транскрипт: Термин «первичный транскрипт», при использовании по тексту настоящего документа, относится к преждевременному транскрипту РНК гена. Например, «первичный транскрипт» все еще содержит интроны и/или еще не содержит полиА-хвост или кэп-структуру, и/или в нем отсутствуют другие модификации, необходимые для его правильного функционирования в качестве транскрипта, такие как, например, обрезка или редактирование.

Промотор: Термины «промотор» или «промоторная последовательность» являются эквивалентными и при использовании по тексту настоящего документа относятся к последовательности ДНК, которая при лигировании с интересующей нуклеотидной последовательностью способна контролировать транскрипцию интересующей нуклеотидной последовательности в РНК. Такие промоторы приводятся, например, в следующих общедоступных базах данных. <http://www.grassius.org/grasspromdb.html>,

<http://mendel.cs.rhul.ac.uk/mendel.php?topic=plantprom>, <http://ppdb.gene.nagoya-u.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>. Представленные в них промоторы могут рассматриваться с применением способов по изобретению и включены в настоящий документ посредством ссылки. Промотор расположен перед (против хода транскрипции) сайтом начала транскрипции целевой нуклеотидной последовательности, транскрипцией которой в мРНК он управляет, вблизи от нее, и обеспечивает сайт для специфического связывания РНК-полимеразой и другими факторами транскрипции для инициации транскрипции. Указанный промотор содержит, например, по меньшей мере, 10 тыс. п.о., например, 5 тыс. п.о. или 2 тыс. п.о., проксимальных по отношению к сайту начала транскрипции. Он также может включать, по меньшей мере, 1500 п.о., проксимальных по отношению к сайту начала транскрипции, предпочтительно, по меньшей мере, 1000 п.о., более предпочтительно, по меньшей мере, 500 п.о., даже более предпочтительно, по меньшей мере, 400 п.о., по меньшей мере, 300 п.о., по меньшей мере, 200 п.о. или, по меньшей мере, 100 п.о. В еще одном предпочтительном варианте осуществления промотор содержит, по меньшей мере, 50 п.о. проксимальных по отношению к сайту начала транскрипции, например, по меньшей мере, 25 п.о. Промотор не содержит областей экзонов и/или интронов или 5'-нетранслируемых областей. Промотор может, например, быть гетерологичным или гомологичным по отношению к соответствующему растению. Последовательность полинуклеотида является «гетерологичной» по отношению к организму или второй последовательности полинуклеотида, если она происходит из чужеродного вида или, если она происходит из того же вида, она является модифицированной по сравнению с исходной формой. Например, промотор, функционально связанный с гетерологичной кодирующей последовательностью, относится к кодирующей последовательности вида, отличного от того вида, из которого был получен промотор, или, если он происходит из того же вида, – к кодирующей последовательности, которая в природе не связана с промотором (например, к генетически модифицированной кодирующей последовательности или к аллелю из другого экотипа или сорта). Подходящие промоторы могут происходить из генов клеток-хозяев, в которых должна происходить экспрессия, или из патогенов этих клеток-хозяев (например, растения или патогены растений, такие как вирусы растений). Специфичный для растения промотор представляет собой промотор, подходящий для регулирования экспрессии в растении. Его можно получить из

растения, а также из патогенов растений, или это может быть синтетический промотор, разработанный человеком. Если промотор представлен индуцируемым промотором, то в ответ на индуцирующий агент скорость транскрипции увеличивается. Кроме того, промотор может регулироваться тканеспецифическим или предпочтительным для ткани образом, при использовании которого он активен только или преимущественно в отношении транскрипции ассоциированной кодирующей области в ткани определенного типа(ов), такой как листья, корни или меристема. Термин «тканеспецифический», применительно к промотору, относится к промотору, который способен направлять селективную экспрессию интересующей нуклеотидной последовательности на конкретный тип ткани (например, лепестки) при относительном отсутствии экспрессии той же самой интересующей последовательности нуклеотида в другом типе ткани (например, в корнях). Тканеспецифичность промотора можно оценить, например, посредством функциональной привязки гена-репортера к последовательности промотора для создания репортерного конструкта, введения репортерного конструкта в геном растения таким образом, чтобы этот репортерный конструкт интегрировался в каждую отдельную ткань полученного трансгенного растения, и выявления экспрессии гена-репортера (например, выявление мРНК, белка или активности белка, кодируемого геном-репортером) в различных тканях трансгенного растения. Обнаружение более высокого уровня экспрессии гена-репортера в одной или нескольких тканях по сравнению с уровнем экспрессии гена-репортера в других тканях показывает, что промотор является специфичным для тканей, в которых обнаруживаются более высокие уровни экспрессии. Термин «клеточно-типоспецифический», применительно к промотору, относится к промотору, который способен направлять селективную экспрессию интересующей нуклеотидной последовательности на конкретный тип клетки при относительном отсутствии экспрессии той же самой интересующей последовательности нуклеотида в другом типе клетки в той же ткани. Термин «клеточно-типоспецифический», применительно к промотору, также означает промотор, способный стимулировать селективную экспрессию интересующей нуклеотидной последовательности в области внутри одной ткани. Клеточную типоспецифичность промотора можно оценить с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области, например, окрашивание активности глюкоксидазы, окрашивание зеленого флуоресцентного белка или

иммуногистохимическое окрашивание. Термин «конститутивный» применительно к промотору или происходящей от промотора экспрессии, означает, что промотор способен направлять транскрипцию функционально связанной молекулы нуклеиновой кислоты в отсутствие стимула (например, теплового шока, химических веществ, света и др.) в большинстве растительных тканей и клеток на протяжении практически всей жизни растения или части растения. Как правило, конститутивные промоторы способны направлять экспрессию трансгена в практически любой клетке и ткани.

Специфичность промотора: Термин «специфичность», применительно к промотору, означает характер экспрессии, придаваемый соответствующим промотором. Специфичность описывает ткани и/или статус развития растения или его части, в которой промотор обеспечивает экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты под контролем соответствующего промотора. Специфичность промотора может также включать условия окружающей среды, при которых промотор может активироваться или подавляться, например, индукция или репрессия биологическими или экологическими стрессами, такими как холод, засуха, ранение или инфекция.

Очищенный: При использовании по тексту настоящего документа термин «очищенный» относится к нуклеотидным или к аминокислотным последовательностям, которые удалены, изолированы или выделены из природной окружающей среды. «Существенно очищенные» молекулы, по меньшей мере, на 60%, предпочтительно, по меньшей мере, на 75%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 90% не содержат других компонентов, с которыми они связаны в природе. Очищенная нуклеотидная последовательность может представлять собой выделенную нуклеотидную последовательность.

Рекомбинантный: Термин «рекомбинантный» по отношению к молекулам нуклеиновой кислоты означает молекулы нуклеиновой кислоты, полученные помощью технологии рекомбинантных ДНК. Молекулы рекомбинантных нуклеиновых кислот могут также включать молекулы, которых как таковых не существует в природе, но которые модифицированы, изменены, мутированы или иным образом изменены человеком. Предпочтительно, «рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты» представляет собой не встречающуюся в природе молекулу нуклеиновой кислоты, последовательность которой отличается от природной

молекулы нуклеиновой кислоты, по меньшей мере, на одну нуклеиновую кислоту. «Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты» может также включать «рекомбинантную конструкцию», которая включает, предпочтительно, функционально связанную последовательность молекул нуклеиновых кислот, не встречающихся в природе в таком порядке. Предпочтительные способы получения указанной рекомбинантной молекулы нуклеиновых кислот могут включать методы клонирования, направленный или ненаправленный мутагенез, синтез или рекомбинантные методы.

Смысловой: Под термином «смысловой» понимают молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую последовательность, которая комплементарна или идентична целевой последовательности, например, последовательность, которая связывается с фактором транскрипции белка и которая участвует в экспрессии данного гена. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит представляющий интерес ген и элементы, обеспечивающие экспрессию указанного гена.

Значительное увеличение или уменьшение: Увеличение или уменьшение, например, ферментативной активности или экспрессии гена, превышающее допустимую погрешность, присущую методу измерения, предпочтительно увеличение или уменьшение примерно в 2 раза или более активности контрольного фермента или экспрессии в контрольной клетке, более предпочтительно увеличение или уменьшение примерно в 5 раз или более, и наиболее предпочтительно увеличение или уменьшение примерно в 10 раз или более.

Малые молекулы нуклеиновых кислот: под «малыми молекулами нуклеиновых кислот» понимаются молекулы, состоящие из нуклеиновых кислот или их производных, таких как РНК или ДНК. Они могут быть двухцепочечными или одноцепочечными и иметь размер от примерно 15 до примерно 30 п.о., например, от 15 до 30 п.о., более предпочтительно от примерно 19 до примерно 26 п.о., например, от 19 до 26 п.о., еще более предпочтительно от примерно 19 до 26 п.о. от примерно 20 до примерно 25 п.о., например, от 20 до 25 п.о. В особенно предпочтительном варианте осуществления олигонуклеотиды имеют размер от примерно 21 до примерно 24 п.о., например, от 21 до 24 п.о. В наиболее предпочтительном варианте осуществления малые молекулы нуклеиновой

кислоты имеют размер примерно 21 п.о. и примерно 24 п.о., например, 21 п.о. и 24 п.о.

Значительно комплементарный: В самом широком смысле термин «значительно комплементарный» при использовании в настоящем документе по отношению к нуклеотидной последовательности по отношению к эталонной или целевой нуклеотидной последовательности, означает нуклеотидную последовательность с процентом идентичности между существенно комплементарной нуклеотидной последовательностью и точной комплементарной последовательностью указанной эталонной или целевой нуклеотидной последовательности, составляющим, по меньшей мере, 60%, более желательно, по меньшей мере, 70%, более желательно, по меньшей мере, 80% или 85%, предпочтительно, по меньшей мере, 90%, более предпочтительно, по меньшей мере, 93%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 95% или 96%, и еще более предпочтительно, по меньшей мере, 97% или 98%, и еще более предпочтительно, по меньшей мере, 99% или наиболее предпочтительно 100% (последнее в данном контексте эквивалентно термину «идентичный»). Предпочтительно идентичность оценивается на участке длиной, по меньшей мере, 19 нуклеотидов, предпочтительно, по меньшей мере, 50 нуклеотидов, более предпочтительно по всей длине последовательности нуклеиновой кислоты относительно указанной эталонной последовательности (если ниже не указано иное). Сравнение последовательностей проводят с использованием GAP-анализа с настройками по умолчанию с помощью приложения GAP SEQWEB пакета программ Wisconsin GCG на основании алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch (1970) J Mol. Biol. 48: 443-453; в соответствии с определением выше). Нуклеотидная последовательность, которая является «значительно комплементарной» эталонной нуклеотидной последовательности, гибридизуется с эталонной нуклеотидной последовательностью в условиях низкой жесткости, предпочтительно в условиях средней жесткости, наиболее предпочтительно в условиях высокой жесткости (в соответствии с определением выше).

«Целевая область», при использовании по тексту настоящего документа, означает область, близкую к, например, 10 оснований, 20 оснований, 30 оснований, 40 оснований, 50 оснований, 60 оснований, 70 оснований, 80 оснований, 90 оснований, 100 оснований, 125 оснований, 150 оснований, 200 оснований или 500

оснований или более от целевого сайта, или включая целевой сайт, в котором последовательность молекулы донорной ДНК вводится в геном клетки.

«Целевой сайт» при использовании по тексту настоящего документа означает положение в геноме, в котором индуцируется двухцепочечный разрыв или же один или пара одноцепочечных разрывов с использованием рекомбинантных технологий, таких как Zn-finger (технология «цинковых пальцев»), TALEN, рестрикционные ферменты, хоуминг-эндонуклеазы, РНК-направляемые нуклеазы, РНК-направляемые нуклеазы, такие как CRISPR/Cas-нуклеазы или нуклеазы и т.п.

Трансген: При использовании по тексту настоящего документа термин «трансген» относится к любой нуклеотидной последовательности, которая вводится в геном клетки путем экспериментальных модификаций. Трансген может представлять собой «эндогенную последовательность ДНК» или «гетерологичную последовательность ДНК» (т.е. «чужеродную ДНК»). Термин «эндогенная последовательность ДНК» относится к нуклеотидной последовательности, которая находится в природном окружении в клетке, в которую она введена, при условии, что она не содержит какой-либо модификации (например, точечной мутации, селективируемого маркерного гена и т.д.) относительно природной последовательности.

Трансгенный: Термин «трансгенный» применительно к организму означает трансформированный, предпочтительно стабильно трансформированный, рекомбинантной молекулой ДНК, которая предпочтительно содержит подходящий промотор, функционально связанный с представляющей интерес последовательностью ДНК.

Вектор: В данном контексте, понятие «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую молекулу нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой интегрированный в геном вектор или «интегрированный вектор», который может быть встроен в хромосомную ДНК клетки-хозяина. Другой тип вектора – это эпизомальный вектор, то есть молекула нуклеиновой кислоты, способная к внехромосомной репликации. Векторы, которые способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны, в настоящем документе именуется векторами экспрессии. За исключением случаев, когда из контекста ясно иное, в

настоящем описании термины «плазмида» и «вектор» используются взаимозаменяемо. Векторы экспрессии, предназначенные для получения РНК в соответствии с описанием в настоящем документе *in vitro* или *in vivo* могут содержать последовательности, распознаваемые любой РНК-полимеразой, включая митохондриальную РНК-полимеразу, РНК pol I, РНК pol II и РНК pol III. Эти векторы можно использовать для транскрипции желаемой молекулы РНК в клетку по настоящему изобретению. Под вектором трансформации растения следует понимать вектор, подходящий для процесса трансформации растения.

Дикий тип: Термин «дикого типа», «природный» или «природного происхождения» в отношении организма, полипептида или последовательности нуклеиновой кислоты означает, что указанный организм встречается в природе или присутствует, по меньшей мере, в одном природном организме, который не изменен, не мутирован и не подвергался иным манипуляциям со стороны человека.

Фигуры:

Фигура 1: Частота событий редактирования моноаллельных TIPS риса с аллелем с инсерционно-делеционной мутацией и без него: парные никазы Cas9 в сравнении с нуклеазой Cas9

ПРИМЕРЫ

Химические вещества и общие методы

Если не указано иное, процедуры клонирования, проводимые для целей настоящего изобретения, включая рестриктазные фрагменты, электрофорез в агарозном геле, очистку нуклеиновых кислот, лигирование нуклеиновых кислот, трансформацию, селекцию и культивирование бактериальных клеток, выполняли согласно описанию в документе (Sambrook et al., 1989). Анализ последовательности рекомбинантной ДНК проводился с использованием секвенатора ДНК с лазерной флуоресценцией (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) по технологии Сэнгера (Sanger et al., 1977). Если не указано иное, химикаты и реагенты были получены от Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, Сент-Луис, США), от Promega (Мэдисон, Висконсин, США), Duchefa (Харлем, Нидерланды) или Invitrogen (Карлсбад, Калифорния, США). Эндонуклеазы рестрикции были получены от New England Biolabs (Ипсвич, Массачусетс, США) или Roche Diagnostics GmbH (Пенцберг, Германия).

Олигонуклеотиды были синтезированы фирмой Eurofins Eurofins Genomics (Эберсберг, Германия) или Integrated DNA Technologies (Коралвилл, Айова, USA).

Пример 1: Скрининг наилучшей комбинации гРНК и донорной ДНК для точного редактирования генов с помощью гомологически направленной репарации у аллогексаплоидной пшеницы

Наш подход к точному редактированию генов у пшеницы был основан на первом скрининге набора различных комбинаций гРНК/донорной ДНК на уровне щиткового каллуса для определения предпочтительной комбинации гРНК/донорной ДНК, которая будет использоваться для получения отредактированных проростков.

В этом примере мы описываем, что для введения конкретной замены одной аминокислоты (I1781L) в кодирующую последовательность гена ацетил-КоА карбоксилазы мы предварительно отобрали 5 различных комбинаций гРНК/донорной ДНК. Было разработано пять различных гРНК, которые направляют Cas9 к 5 различным целевым сайтам рядом с кодоном-мишенью для замены I1781L. Векторы sgРНК pBAY02528 (SEQ ID NO: 5), pBAY02529 (SEQ ID NO: 6), pBAY02530 (SEQ ID NO: 7), pBAY02531 (SEQ ID NO: 8) и pBAY02532 ((SEQ ID NO: 9) – все содержат кассету для экспрессии гРНК, которая может направлять Cas9 для создания разрыва двухцепочечной ДНК в целевом сайте последовательности TS1 CTAGGTGTGGAGAACATACA-TGG (SEQ ID NO: 50), последовательности TS2 GAAGGAGGATGGGCTAGGTG-TGG (SEQ ID NO: 51), последовательности TS3 ATAGGCCCTAGAATAGGCAC-TGG (SEQ ID NO: 52), последовательности TS4 CTCCTCATAGGCCCTAGAAT-AGG (SEQ ID NO: 53), TS5 СТАТТGCCAGTGCСТАТТСТ-AGG (SEQ ID NO: 54), соответственно. Были разработаны три вектора донорных ДНК: pBAY02539 (SEQ ID NO: 13), pBAY02540 (SEQ ID NO: 14) и pBAY02541 (SEQ ID NO: 15). И каждый из них включает фрагмент ДНК размером 803 п.о. *Triticum aestivum*, субгеном В сорта Fielder, ген ацетил-КоА карбоксилазы, содержащий желаемую мутацию (замена I1781L). 3 донорные ДНК отличаются только несколькими молчащими мутациями, чтобы предотвратить дробление донорной ДНК и отредактированного аллеля с желаемой мутацией (I1781L). Сердцевинная последовательность из 3 п.о. (СТС) в каждой из донорной ДНК была фланкирована левым и правым гомологичными плечами длиной около 400 п.о., которые идентичны последовательностям ацетил-КоА

карбоксилазы дикого типа субгенома В. Экспрессия Cas9 pBAY02430 (SEQ ID NO: 1) содержит кодон нуклеазы Cas9, оптимизированный для пшеницы, и находилась под контролем промотора pUbiZm и терминатора 3'35S. Плазмидную ДНК вектора с нуклеазой Cas9, гРНК, донорную ДНК смешали с плазмидой pIB26 (SEQ ID NO: 18), содержащей гибридный ген egfp-bar для проведения селекции по фосфинотрицину (ФФТ) и скрининга зеленому флуоресцентному белку.

Незрелые зародыши размером 2-3 мм отделяли от стерилизованных колосьев пшеницы сорта Fielder и бомбардировали с использованием системы доставки частиц PDS-1000/He в соответствии с описанием в Sparks and Jones (Cereal Genomics: (Cereal Genomics: Methods in Molecular biology, том 1099, глава 17). Для бомбардировки использовали следующие смеси ДНК:

- 1) pBAY02430 (Cas9), pBAY02539 (донорная ДНК-1), pBAY02528 (гРНК1), pIB26
- 2) pBAY02430 (Cas9), pBAY02539 (донорная ДНК-1), pBAY02529 (гРНК2), pIB26
- 3) pBAY02430 (Cas9), pBAY02540 (донорная ДНК-2), pBAY02530 (гРНК3), pIB26
- 4) pBAY02430 (Cas9), pBAY02540 (донорная ДНК-2), pBAY02531 (гРНК4), pIB26
- 5) pBAY02430 (Cas9), pBAY02540 (донорная ДНК-2), pBAY02532 (гРНК5), pIB26
- 6) pBAY02430 (Cas9), pBAY02541 (донорная ДНК-3), pBAY02530 (гРНК3), pIB26
- 7) pBAY02430 (Cas9), pBAY02541 (донорная ДНК-3), pBAY02531 (гРНК4), pIB26
- 8) pBAY02430 (Cas9), pBAY02541 (донорная ДНК-3), pBAY02532 (гРНК5), pIB26

Незрелые эмбрионы, подвергшиеся бомбардировке, поместили в неселективную среду для индукции каллюса на несколько дней, затем переместили в среду для селекции, содержащую PPT, как описано в документе Ishida et al. (Агробактериальные протоколы: том 1, Методы молекулярной биологии, 1223, глава 15). Через 3-4 недели геномную ДНК извлекали из щитковых каллусов отдельных незрелых эмбрионов для ПЦР-анализа. Для специфической

амплификации отредактированного гена ацетил-КоА карбоксилазы были разработаны следующие пары праймеров: пара праймеров НТ-18-111 прямой / НТ-18-112 обратный для донорной ДНК pBAY02539 (SEQ ID NO: 13), пара праймеров НТ-18-113 прямой/НТ-18-112 обратный для донорной ДНК pBAY02540 (SEQ ID NO: 14) и донорной ДНК pBAY02541 (SEQ ID NO: 15) (**Таблица 1**). Эффективность точного редактирования генов была самой высокой при использовании донорной ДНК-1 (pBAY02539) (SEQ ID NO:13) в сочетании с гРНК1 pBAY02528 (SEQ ID NO:5). При применении этого сочетания гРНК/донорной ДНК 13% щитковых каллусов, полученных из отдельных незрелых зародышей, давали при редактировании специфичный ПЦР, продукт амплификации ожидаемого размера (**Таблица 2**).

Для получения растений пшеницы с мутацией ацетил-КоА карбоксилазы (P1781L) мы провели совместную бомбардировку незрелых зародышей пшеницы смесью ДНК 1) pBAY02430 (Cas9) (SEQ ID NO: 1) pBAY02539 (донорная ДНК-1) (SEQ ID NO: 13), pBAY02528 (гРНК1) (SEQ ID NO: 5), pIB26 (SEQ ID NO: 18), и мы показали, что растения пшеницы, содержащие целевую аминокислотная замену (P1781L) в одном или нескольких гомеоаллелях путем непрямой селекции на PPT можно было получить с относительно высокой степенью успешности (см. пример 2). Это демонстрирует, что предварительный скрининг различных комбинаций гРНК/донорной ДНК для точного HR-опосредованного редактирования генов в ткани щитка из подвергшихся бомбардировке незрелых эмбрионов, как описано в этом примере, позволяет сделать хороший прогноз относительно возможности получения растений пшеницы, имеющих желательную модификацию аминокислоты в одном или нескольких гомеоаллелях аллогексаплоидной пшеницы.

Таблица 1. Праймеры для редактируемой ПЦР (ACCaseI1781L)

Донорная ДНК	прямой праймер			обратный праймер		
	название	последовательность	SEQ ID NO	название	последовательность	SEQ ID NO
pBA Y02540	HT-18-113	GCTAGGTGTGGAGAACCTC	30	HT-18-112	ACTTGCCCAGCACGAGGAAC	29
pBA Y02541	HT-18-113	GCTAGGTGTGGAGAACCTC	30	HT-18-112	ACTTGCCCAGCACGAGGAAC	29
pBA Y02539	HT-18-111	GTTGGGCGTCGAGAACCTC	28	HT-18-112	ACTTGCCCAGCACGAGGAAC	29

Таблица 2. Скрининг различных комбинаций гРНК/донорной ДНК для редактирования ацетил-КоА карбоксилазы I1781L: Количество образцов ткани щитка, положительных в при ПЦР редактировании (ацетил-КоА карбоксилаза I1781L)

Доставка ДНК	Кол-во образцов, прошедших анализ	Образцы с ожидаемым фрагментом ПЦР	
		Кол-во образцов*	%
pVAУ02430 (Cas9) + pVAУ02539 (донорная ДНК-1) + pВау02528 (гРНК1) + РІВ26	265	35	13,2
pVAУ02430 (Cas9) + pVAУ02539 (донорная ДНК-1) + pВау02529 (гРНК2) + РІВ26	275	5	1,8
pVAУ02430 (Cas9) + pVAУ02540 (донорная ДНК-2) + pВау02530 (гРНК3) + РІВ26	137	1	0,7
pVAУ02430 (Cas9) + pVAУ02540 (донорная ДНК-2) + pВау02531 (гРНК4) + РІВ26	109	4	3,6
pVAУ02430 (Cas9) + pVAУ02540 (донорная ДНК-2) + pVAУ02532 (гРНК5) + РІВ26	122	0	0
pVAУ02430 (Cas9) + pVAУ02541 (донорная ДНК-3) + pВау02530 (гРНК3) + РІВ26	103	0	0
pVAУ02430 (Cas9) + pVAУ02541 (донорная ДНК-3) + pВау02531 (гРНК4) + РІВ26	182	3	1,6
pVAУ02430 (Cas9) + pVAУ02541 (донорная ДНК-3) + pВау02532 (гРНК5) + РІВ26	112	0	0

* положительными считались только образцы с амплифицированным редактируемым фрагментом ПЦР с концентрацией > 2 нг/мкл

Пример 2: Зависимое от гомологии точное редактирование генов для введения мутации I1781L в ген ацетил-КоА карбоксилазы аллогексаплоидной пшеницы с помощью нуклеазы Cas9.

Мы продемонстрировали, что, используя нуклеазу Cas9 и комбинацию гРНК/донорной ДНК, прошедшую предварительный скрининг, на ее способность к потенциальному HR-опосредованному точному редактированию генов в

аллогексаплоидной пшенице, как описано в примере 1, желаемую мутацию можно ввести в кодон-мишень в одном или нескольких гомеоаллелях. Вектор сгРНК pBAY02528 (SEQ ID NO: 5) содержит кассету для экспрессии гРНК1, которая направляет нуклеазу Cas9 для создания разрыва двухцепочечной ДНК в целевом сайте TS1, последовательность CTAGGTGTGGAGAACATACA-TGG (SEQ ID NO: 50), расположенном над кодоном-мишенью. Донорная ДНК pBAY2539 была разработана для введения замен 2 оснований в кодоне-мишени (ATA на CTC), что приводило к изменению I1781L на уровне белка. Донорная ДНК включает фрагмент ДНК размером 803 п.о. *Triticum aestivum*, субгеном В сорта Fielder, ген ацетил-КоА карбоксилазы, содержащий желаемую мутацию (замена I1781L). Донорная ДНК также содержит некоторые другие молчащие мутации, чтобы предотвратить дробление донорной ДНК и отредактированного аллеля с желаемой мутацией (I1781L). Сердцевинная последовательность из 3 п.о. (CTC) в донорной ДНК была фланкирована левым и правым гомологичными плечами длиной около 400 п.о., которые идентичны последовательностям ацетил-КоА карбоксилазы дикого типа субгенома В.

Незрелые зародыши размером 2-3 мм отделяли от стерилизованных колосьев пшеницы сорта Fielder и бомбардировали с использованием системы доставки частиц PDS-1000/He в соответствии с описанием в Sparks and Jones (*Cereal Genomics: Methods in Molecular biology*, том 1099, глава 17). Плазмидную ДНК векторов pBAY02430 (нуклеаза Cas9) (SEQ ID NO: 1), pBAY02528 (гРНК) (SEQ ID NO: 5), pBAY02539 (донорная ДНК) (SEQ ID NO: 13) смешали с плазмидой pIB26 (SEQ ID NO: 18). Вектор pIB26 (SEQ ID NO: 18) содержит слитый ген *egfp-bar* под контролем промотора 35S. Незрелые эмбрионы, подвергшиеся бомбардировке, поместили в неселективную среду для индукции каллуса на 1-2 недели, затем переместили в среду для селекции, содержащую PPT, после чего устойчивые к PPT каллусы отбирали и переносили в среду для регенерации для образования побегов, как описано в документе Ishida et al. (*Agrobacterium Protocols: том 1, Methods in Molecular Biology*, том 1223, глава 15).

Все растения, которые развились из одного незрелого зародыша, рассматривали как единый пул. Геномную ДНК экстрагировали из объединенных в пул образцов листьев и сконструировали набор праймеров (HT-18-111 Forward (SEQ ID NO: 28) / HT-18-112 Reverse (SEQ ID NO: 29)) для специфической

амплификации отредактированного гена ацетил-КоА карбоксилазы. Проростки в составе пула, которые дали ожидаемый ПЦР-фрагмент в этой специфической ПЦР 1-го редактирования, затем переносили в отдельные пробирки и дополнительно анализировали посредством выполнения ПЦР с использованием набора праймеров HT-18-111 (SEQ ID NO: 28) /HT-18-112 (SEQ ID NO: 29) и путем глубокого секвенирования. Всего в 9 экспериментах 337, 326, 415, 322, 350, 329, 261, 361 и 362 эмбриона бомбардировали смесью плазмидной ДНК pBAY02430 (нуклеаза Cas9) (SEQ ID NO: 1), pBAY02528 (гРНК) (SEQ ID NO: 5), pBAY02539 (донорная ДНК) (SEQ ID NO: 13) и pIB26 (SEQ ID NO: 18). В рамках этих 9 экспериментов устойчивые к фосфинотрицину (PPT) регенерирующие каллусы побегов были получены из в общей сложности 132, 172, 111, 177, 107, 166, 122, 244 и 279 незрелых эмбрионов. Специфическая амплификация отредактированного гена ацетил-КоА карбоксилазы наблюдалась в 8, 17, 15, 9, 16, 7, 6, 9 и 8 объединенных в пул образцах листьев. Специфическая ПЦР второго редактирования была проведена в общей сложности на 51, 62, 66, 33, 49, 25, 35, 42 и 31 отдельных растениях, полученных из 8, 15, 15, 8, 16, 7, 6, 9 и 8 пулов проростков, оцененных как положительные в результате ПЦР 1-го редактирования, и специфическая амплификация отредактированного гена ацетил-КоА карбоксилазы наблюдалась в 16, 28, 12, 25, 19, 19, 13, 21 и 12 отдельных проростках, полученных из, соответственно, 6, 11, 8, 7, 10, 7, 4, 8 и 8 пулов проростков (Таблица 3). Поскольку каждый пул проростков был получен из одного незрелого зародыша, все проростки, полученные из одного незрелого зародыша (пул проростков), рассматриваются как независимое отредактированное событие, хотя здесь нельзя исключить, что может быть несколько независимых отредактированных событий между отдельными побегами, полученными от одного незрелого эмбриона, оцененного как положительный по результатам ПЦР 2-го редактирования. На одном растении из каждого события, оцененного как положительное по результатам ПЦР 2-го редактирования, проводили глубокое секвенирование. Область, окружающую предполагаемый целевой сайт, амплифицировали методом ПЦР с полимеразой высокого качества Q5 (M0492L) с помощью вложенной ПЦР. Для 1-й ПЦР использовали пару праймеров HT-18-162 (SEQ ID NO: 34)/HT-18-112 (SEQ ID NO: 29). Эти праймеры были расположены за пределами гомологических плеч донорной ДНК для амплификации фрагмента длиной 1736 п.о. Для вложенной ПЦР с целью амплификации области размером в 386 п.о. для секвенирования

следующего поколения использовали пару праймеров HT-18-048 (SEQ ID NO: 19)/HT-18-053 (SEQ ID NO: 21).

Мы оценили частоту редактирования, рассчитав процент прочтений последовательности, демонстрирующих наличие желаемых мутаций (аминокислотная замена) в кодоне-мишени, как указано донорной ДНК, в виде доли от общего числа прочтений. Эти данные обобщены в таблице 4, где показан процент точно отредактированных прочтений с желаемой мутацией (замена I1781L) и процент прочтений дикого типа на основе общего количества прочтений для 64 проростков из 59 независимых событий. Контрольный образец из проростка ТМТА0136-Ctrl0001-01\$002, полученный из незрелого эмбриона, не подвергнутого бомбардировке, показал около 100% прочтений дикого типа и, как и ожидалось, не имел точно отредактированных прочтений.

Эти данные глубокого секвенирования показали точное редактирование генов гомологичной рекомбинацией (HR) от одного до 4 аллелей нативного гена ацетил-КоА карбоксилазы в аллогексаплоидной пшенице.

HR-опосредованный точный донор, приводящий к желаемой аминокислотной замене и введению дополнительных молчащих мутаций, как указано донорной ДНК, был дополнительно подтвержден секвенированием по Сэнгеру клонированных ПЦР-фрагментов. Для 11 из этих событий, проанализированных с помощью глубокого секвенирования, ПЦР-амплификация над целевой областью с парой праймеров HT-18-162 прямой (SEQ ID NO: 34) / HT-18-112 (SEQ ID NO: 29) обратный, клонирование и секвенирование по Сэнгеру выполнялось для субгеномной характеристики. На одно событие секвенировали от 52 до 96 клонов. Эти данные обобщены в таблице 5 и показывают, что растения с точно отредактированным(и) аллелем(ями) чаще всего содержат также аллель(и) с инсерционно-делеционными мутациями, полученными из-за негомологичного соединения концов, а иногда также аллель(и) дикого типа. Эти растения T0 перенесли в теплицу для разведения семян. Растения из независимых событий с точным отредактированным аллелем в разных субгеномах можно скрещивать для создания растений с желаемой аминокислотной модификацией, например, все 3 гомеологичные копии гена ацетил-КоА карбоксилазы и нежелательные аллели с инсерционно-делеционными мутациями, полученными из-за негомологичного соединения концов, удаляются путем сегрегации потомства.

Таблица 3. Количество отредактированных проростков ацетил-КоА карбоксилазы I1781L исходя из результатов редактирования анализа ПЦР

№	Кол-во бомбардированных эмбрионов	Каллусы, регенерирующие побеги PPT ^R	Кол-во положительных пулов листьев в ПЦР 1-го редактирования	Кол-во проростков, проверенных в ходе ПЦР 2-го редактирования (полученные из кол-ва пулов листьев*)	Кол-во отдельных проростков, признанных положительными по результатам ПЦР 2-го редактирования (полученные из кол-ва пулов листьев*)
1	337	132	8	51 (8)	16 (6)
2	326	172	17	62 (15)	28 (11)
3	415	111	15	66 (15)	12 (8)
4	322	177	9	33 (8)	25 (7)
5	350	107	16	49 (16)	19 (10)
6	329	166	7	25 (7)	19 (7)
7	261	122	6	35 (6)	13 (4)
8	361	244	9	42 (9)	21 (8)
9	362	279	8	31 (8)	12 (8)

*каждый отдельный пул листьев получен из одного незрелого зародыша

Таблица 4. Процент (%) точно отредактированных прочтений в целевом локусе ацетил-КоА-карбоксилазы (ACCase I1781L) в отдельных проростках из независимых событий, оцененных как положительные по результатам ПЦР 2-го редактирования

Событие	Секвенирование следующего поколения на отдельных побегах из независимых событий, признанных положительными по результатам ПЦР 2-го редактирования			Секвенирование по Сэнгеру
	Целевое прочтение	Процент отредактированных прочтений	Процент прочтений дикого типа	
TMTA0136-Ctrl0001-01\$002	40709	0	99,78	
TMTA0131-0003-B01-04\$001	41239	27,75	0,05	x
TMTA0131-0030-B01-02\$001	42137	20,53	0,07	
TMTA0131-0089-B01-01\$001	40069	16,78	53,99	x
TMTA0131-0091-B01-01\$001	36830	23,25	17,63	x

TMTA0132-0005-B01-02\$001	40995	9,19	51,37	
TMTA0132-0038-B01-01\$001	42379	8	59,05	
TMTA0132-0058-B01-02\$001	43429	21,39	0,05	
TMTA0132-0075-B01-03\$001	50651	16,35	0,04	
TMTA0132-0079-B01-01\$001	40691	19,22	32,75	x
TMTA0132-0082-B01-01\$001	102234	21,17	0,01	
TMTA0132-0083-B01-01\$001	44100	20,42	0	
TMTA0132-0084-B01-01\$001	34262	19,75	17,78	
TMTA0132-0130-B01-02\$001	28768	21,25	0,02	
TMTA0132-0138-B01-02\$001	34718	20,91	0	
TMTA0136-0013-B01-01\$001	42346	60,42	0	x
TMTA0136-0039-B01-02\$001	41189	20,05	78,93	x
TMTA0136-0055-B01-03\$001	33875	21,23	0,03	
TMTA0136-0081-B01-01\$001	49956	19,38	13,46	
TMTA0136-0108-B01-01\$001	51522	27,33	0,01	x
TMTA0136-0110-B01-01\$001	52048	16,69	0	
TMTA0137-0016-B01-02\$001	19342	17,06	14,67	
TMTA0137-0016-B01-04\$001	19125	16,88	14,27	
TMTA0137-0017-B01-03\$001	10598	17,42	14,87	
TMTA0137-0018-B01-04\$001	20526	16,23	15,17	
TMTA0137-0105-B01-01\$001	23270	4,62	72,13	
TMTA0137-0107-B01-01\$001	27218	18,93	21,18	
TMTA0137-0155-B01-01\$001	10940	25,43	0	
TMTA0138-0025-B01-03\$001	33577	19,53	16,75	
TMTA0138-0028-B01-01\$001	40346	16,09	0	
TMTA0138-0034-B01-01\$001	35875	30,22	0,07	
TMTA0138-0035-B01-01\$001	129047	31,98	0,01	x
TMTA0138-0041-B01-01\$001	44938	18,35	0,02	
TMTA0138-0049-B01-01\$001	45611	21,59	0,04	
TMTA0138-0058-B01-03\$001	43272	16,53	12,43	
TMTA0138-0059-B01-02\$001	39400	24,16	17,8	
TMTA0138-0072-B01-04\$001	34732	20,41	11,3	
TMTA0138-0083-B01-01\$001	31915	14,98	12,2	
TMTA0140-0004-B01-04\$001	40316	22,64	0,02	
TMTA0140-0007-B01-01\$001	33213	17,7	23,4	
TMTA0140-0013-B01-03\$001	45408	20,8	0	
TMTA0140-0048-B01-01\$001	36021	65,03	3,94	x
TMTA0140-0050-B01-01\$001	53818	32,57	0,04	x
TMTA0143-0001-B01-01\$001	35829	24,15	0,03	
TMTA0143-0086-B01-01\$001	107131	34,64	0,05	x
TMTA0147-0001-B01-02\$001	34822	11,36	18,7	
TMTA0171-0047-B01-02\$001	26724	11,18	31,67	
TMTA0171-0053-B01-01\$001	27004	12,49	23,24	
TMTA0171-0053-B01-03\$001	37877	11,17	26,94	
TMTA0171-0080-B01-02\$001	26062	7,11	45,67	

ТМТА0171-0086-В01-03\$001	21361	15,46	0,01	
ТМТА0171-0086-В01-05\$001	44053	16,87	20,33	
ТМТА0171-0134-В01-02\$001	29626	9,21	0	
ТМТА0171-0220-В01-01\$001	29826	27,56	16,94	
ТМТА0171-0220-В01-03\$001	35492	29,21	16,84	
ТМТА0172-0001-В01-04\$001	37739	12,56	15,61	
ТМТА0172-0180-В01-02\$001	36540	26,34	16,21	
ТМТА0172-0180-В01-05\$001	43100	25,22	14,44	
ТМТА0172-0183-В01-01\$001	39955	11,93	0,01	

Таблица 5. Генотипы локуса ацетил-КоА карбоксилазы в 11 растениях Т0 из независимых событий с помощью секвенирования по Сэнгеру клонированных фрагментов ПЦР. Точное редактирование относится к наличию точно отредактированного аллеля ацетил-КоА карбоксилазы с желаемой аминокислотной заменой и дополнительными молчащими мутациями в соответствии с указаниями донорской ДНК, инсерционно-делеционная мутация относится к наличию мутации из-за негомологичного соединения концов, а понятие дикий тип относится к наличию нативной последовательности ацетил-КоА карбоксилазы дикого типа. Цифры перед выражениями «точное редактирование», «дикий тип», «инсерционно-делеционная мутация» указывают на частоту, с которой были идентифицированы эти 3 разных варианта аллеля ацетил-КоА карбоксилазы.

Событие	Секвенирование следующего поколения		Секвенирование по Сэнгеру		
	% отред.	% дикого типа	А	В	Д
ТМТА0131-0003-В01-04\$001	27,75	0,05	45 вставка	14 точн. ред.; 25 вставка	нет чтений
ТМТА0131-0089-В01-01\$001	16,78	53,99	28 ДТ	7 ДТ; 16 вставка	11 точн. ред.; 11 вставка; 6ДТ
ТМТА0131-0091-В01-01\$001	23,25	17,63	29 вставка	17 точн. ред.; 12 вставка	12 вставка; 12ДТ
ТМТА0132-0079-В01-01\$001	19,22	32,75	12 точн. ред.; 21 ДТ	9 вставка; 10 ДТ	18 вставка; 12 вставка
ТМТА0136-0039-В01-02\$001	20,05	78,93	34 ДТ	11 точн. ред.; 24 ДТ	1 точн. ред.; 30 ДТ
ТМТА0136-0108-В01-01\$001	27,33	0,01	18 точн. ред.; 17 вставка	13 вставка	18 вставка

ТМТА0138-0035- В01-01\$001	31.98	0,01	21 точн. ред.; 17 втавка	12 втавка; 20 втавка	14 точн. ред.
ТМТА0140-0048- В01-01\$001	65.03	3,94	28 втавка	33 точн. ред.; 6 втавка	15 точн. ред.
ТМТА0140-0050- В01-01\$001	32,57	0,04	10 точн. ред.; 13 втавка	7 точн. ред.; 22 втавка	14 точн. ред.; 11 втавка
ТМТА0143-0086- В01-01\$001	34.64	0,05	14 точн. ред.; 9 втавка	19 точн. ред.; 15 втавка	23 втавка
ТМТА0136-0013- В01-01\$001	59	6,79	8 точн. ред.	31 точн. ред.	13 втавка

Пример 3: Зависимое от гомологии точное редактирование генов для введения мутации P1781L в ген ацетил-КоА карбоксилазы аллогексаплоидной пшеницы с помощью спаренной никазы Cas9.

В следующих примерах описано зависимое от гомологии точное редактирование генов для введения мутации P1781L в ген ацетил-КоА карбоксилазы аллогексаплоидной пшеницы с помощью спаренной никазы Cas9. Используя никазу Cas9 и две сгРНК, ведущие никазу SpCas9 к 2 сайтам-мишеням (TS1, T2) в непосредственной близости друг от друга на противоположных цепях и в непосредственной близости от целевого кодона ацетил-КоА карбоксилазы P1781 и донорной ДНК, желаемую мутацию можно эффективно ввести в кодон-мишень. Был построен вектор экспрессии никазы Cas9 pBay02734 (SEQ ID NO: 3). Путем мутации аспарагиновой кислоты в аланин в позиции 10 в домене RuvC (мутация D10A) была кодон никаза Cas9 был оптимизирован для пшеницы и находился под контролем промотора pUbiZm и терминатора 3'35S. Две сгРНК были разработаны для нацеливания на все копии генов в 3 субгеномах пшеницы A, B и D и для формирования 3'-липких концов ДНК на 32 п.о., охватывающих целевой кодон. Вектор сгРНК pBAY02528 (SEQ ID NO: 5) содержит кассету для экспрессии гРНК1, которая направляет никазу Cas9 для создания разрыва одноцепочечного разрыва в последовательности CTAGGTGTGGAGAACATACA-TGG (SEQ ID NO:50) целевого сайта TS1. Вектор сгРНК pBAY02531 содержит кассету для экспрессии последовательности CTCCTCATAGGCCCTAGAAT-AGG (SEQ ID NO:53) целевого сайта TS2, нацеленного на гРНК2. Донорная ДНК pBAY02540 (SEQ ID NO: 14) была разработана для введения 2 замен оснований в кодоне-мишени (ATA на CTC), что привело к изменению P1781L на уровне белка.

Донорная ДНК включает фрагмент ДНК размером 803 п.о. *Triticum aestivum*, субгеном В сорта Fielder, ген ацетил-КоА карбоксилазы, содержащий желаемую мутацию (замена I1781L). Донорная ДНК также содержит некоторые другие молчащие мутации, чтобы предотвратить дробление донорной ДНК и отредактированного аллеля с желаемой мутацией (I1781L). Сердцевинная последовательность из 3 п.о. (СТС) в донорной ДНК была фланкирована левым и правым гомологичными плечами длиной около 400 п.о., которые идентичны последовательностям ацетил-КоА карбоксилазы дикого типа субгенома В.

Незрелые зародыши размером 2-3 мм отделяли от стерилизованных колосьев пшеницы сорта Fielder и бомбардировали с использованием системы доставки частиц PDS-1000/He в соответствии с описанием в Sparks and Jones (*Cereal Genomics: Methods in Molecular biology*, том 1099, глава 17). Плазмидную ДНК векторов pBAY02734 (никаза Cas9) (SEQ ID NO: 3), pBAY02528 (rPHK1) (SEQ ID NO: 5), pBAY02531 (rPHK2) (SEQ ID NO: 8), pBAY02540 (донорная ДНК) (SEQ ID NO: 14) смешали с плазмидой pIB26 (SEQ ID NO: 18). Вектор pIB26 (SEQ ID NO: 18) содержит слитый ген *egfp-bar* под контролем промотора 35S. Незрелые эмбрионы, подвергшиеся бомбардировке, поместили в неселективную среду для индукции каллуса на 1-2 недели, затем переместили в среду для селекции, содержащую PPT, после чего устойчивые к PPT каллусы отбирали и переносили в среду для регенерации для образования побегов, как описано в документе Ishida et al. (*Агробактериальные протоколы: том 1, Методы молекулярной биологии*, 1223, глава 15).

Все растения, которые развились из одного незрелого зародыша, рассматривали как единый пул. Геномную ДНК экстрагировали из объединенных в пул образцов листьев и сконструировали набор праймеров (HT-18-113 Forward / HT-18-112 Reverse (SEQ ID NO: 30; 29)) для специфической амплификации отредактированного гена ацетил-КоА карбоксилазы. Проростки в составе пула, которые дали ожидаемый ПЦР-фрагмент в этой специфической ПЦР 1-го редактирования, затем переносили в отдельные пробирки и дополнительно анализировали посредством выполнения ПЦР с использованием набора праймеров HT-18-113/HT-18-112 (SEQ ID NO: 30; 29) и путем глубокого секвенирования. Всего в 6 экспериментах 358, 423, 365, 355, 409 и 395 эмбрионов бомбардировали смесью плазмидной ДНК pBAY02734 (никаза Cas9) (SEQ ID NO: 3), pBAY02528

(гРНК1) (SEQ ID NO: 5), pBAY02531 (гРНК2) (SEQ ID NO: 8), pBAY02540 (донорная ДНК) (SEQ ID NO: 14) и pIB26 (SEQ ID NO: 18). В рамках этих 6 экспериментов устойчивые к фосфинотрицину (PPT) регенерирующие каллусы побегов были получены из в общей сложности 195, 163, 192, 181, 268 и 190 незрелых эмбрионов. Специфическая амплификация отредактированного гена ацетил-КоА карбоксилазы наблюдалась в 13, 6, 44, 22, 21 и 22 объединенных в пул образцах листьев. Специфическая ПЦР второго редактирования была проведена в общей сложности на 45, 20, 258, 64, 94, 93 отдельных растениях, полученных из 11, 5, 39, 17, 16 и 20 пулов проростков, оцененных как положительные в результате ПЦР 1-го редактирования. Специфическая амплификация отредактированного гена ацетил-КоА карбоксилазы наблюдалась в 22, 18, 93, 41, 18 и 35 отдельных побегах, полученных из, соответственно, 11, 5, 33, 14, 12 и 17 пулов проростков (**Таблица 6**). Поскольку каждый пул проростков был получен из одного незрелого зародыша, все проростки, полученные из одного незрелого зародыша (пул проростков), рассматриваются как независимое отредактированное событие, хотя здесь нельзя исключить, что может быть несколько независимых отредактированных событий между отдельными побегами, полученными от одного незрелого эмбриона, оцененного как положительный по результатам ПЦР 2-го редактирования. На одном растении из каждого события, оцененного как положительное по результатам ПЦР 2-го редактирования, проводили глубокое секвенирование. Область, окружающую предполагаемый целевой сайт, амплифицировали методом ПЦР с полимеразой высокого качества Q5 (M0492L) с помощью вложенной ПЦР. Для 1-й ПЦР использовали пару праймеров HT-18-162 HT-18-112 (SEQ ID NO 34; 29). Эти праймеры были расположены за пределами гомологических плеч донорной ДНК для амплификации фрагмента длиной 1736 п.о. Для вложенной ПЦР с целью амплификации области размером 386 п.о. для секвенирования следующего поколения использовали пару праймеров HT-18-048/ HT-18-053 (SEQ ID NO: 19, 21).

Мы оценили частоту редактирования, рассчитав процент прочтений последовательности, демонстрирующих наличие желаемой мутации в кодоне-мишени, в виде доли от общего числа прочтений. Эти данные обобщены в таблице 7, где для 57 проростков, все из которых полученные из независимых событий, показано общее количество прочтений, процент прочтений с желаемой мутацией

(замена P1781L), процент прочтений с желаемой мутацией и все молчащие мутации, присутствующие в ДНК донора, и процент прочтений дикого типа. Эти данные глубокого секвенирования показали, что от одного до 4 аллелей нативного гена ацетил-КоА карбоксилазы в аллогексаплоидной пшенице содержат желаемую замену P1781L. Эти данные также показывают, что в растениях с желаемой аминокислотной заменой не всегда были введены все молчащие мутации из репарационной ДНК. Молчащие мутации располагались вокруг целевого сайта TS2 (гРНК2). Эти данные также показывают, что около 50% (28/57) растений с аллелем(ями) с желаемым редактированием (P1781L) не содержат прочтений с инсерционно-делеционными мутациями, полученными из-за негомологичного соединения концов. В остальных 50 % число прочтений с инсерционно-делеционными мутациями, полученными из-за негомологичного соединения концов, иногда было очень низким. И напротив, при использовании нуклеазы CRISPR/Cas9 вместо никазы CRISPR/Cas от 98% до 100% событий с одним или несколькими точно отредактированными аллелями также содержат аллель(и) с инсерционно-делеционными мутациями, полученными из-за негомологичного соединения концов (Таблица 4).

Отсутствие аллелей с инсерционно-делеционными мутациями в событиях с точно отредактированными аллелями с использованием никазы облегчит изучение эффектов дозировки при воздействии на производительность точно отредактированного аллеля(ей), поскольку один или несколько субгеномов растений пшеницы (A, B, D), которые являются гомозиготными (HH), гемизиготными (Hh) и растениями дикого типа (hh), для точного редактирования станут доступны уже в поколении T1 для дальнейшей оценки продуктивности. Растения из независимых событий с точным отредактированным аллелем в разных субгеномах можно скрещивать для создания растений с желаемой аминокислотной модификацией, например, все 3 гомеологичные копии гена целевого гена.

Таблица 6. Количество проростков ацетил-КоА карбоксилазы I1781L, отредактированных за счет использования спаренной системы Cas9 исходя из результатов редактирования анализа ПЦР

№	Кол-во бомбардированных эмбрионов	Каллусы, регенерирующие побеги PPT ^R	Кол-во положительных пулов листьев в ПЦР 1-го редактирования	Кол-во проростков, проверенных в ходе ПЦР 2-го редактирования (полученные из кол-ва пулов листьев*)	Кол-во отдельных проростков, признанных положительными по результатам ПЦР 2-го редактирования (полученные из кол-ва пулов листьев*)
1	358	195	13	45 (11)	22(11)
2	423	163	6	20 (5)	18 (5)
3	365	192	44	258 (39)	93 (33)
4	355	181	22	64 (17)	41 (14)
5	409	268	21	125 (19)	18 (12)
6	395	190	22	118 (22)	35 (17)

Таблица 7. Процент (%) точно отредактированных прочтений в целевом локусе ацетил-КоА-карбоксилазы (ACCase I1781L) в отдельных проростках из независимых событий, оцененных как положительные по результатам ПЦР 2-го редактирования

Событие	Секвенирование следующего поколения на отдельных побегах из независимых событий, признанных положительными по результатам ПЦР 2-го редактирования				Кол-во прочтений с инсерционными-делеционными мутациями
	Целевые прочтения	Процент отредактированных прочтений I>L	Процент отредактированных I>L + все прочтения с молчащей мутацией	Процент дикого типа	
TMTA0252-0018-B01-01\$001	22708	31,72	0	29,17	
TMTA0252-0020-B01-03\$001	58416	14,89	14,29	40,9	
TMTA0252-0022-B01-04\$001	52965	23,84	0	71,26	x
TMTA0252-0038-B01-01\$001	54433	21,98	21,04	56,1	

TMTA0252-0072-B01-03\$001	53496	18,55	0	76,46	x
TMTA0253-0060-B01-01\$001	37901	17,46	16,66	73,37	
TMTA0254-0001-B01-03\$001	53446	29,83	27,68	65,81	x
TMTA0254-0002-B01-01\$001	51254	18,46	0	76,5	x
TMTA0254-0009-B01-02\$001	56029	41,18	21,06	53,65	x
TMTA0254-0010-B01-03\$001	51141	41,01	20,72	53,37	x
TMTA0254-0045-B01-01\$001	39511	21,12	19,94	73,14	x
TMTA0254-0054-B02-01\$001	41727	20,19	0	72,78	x
TMTA0254-0068-B01-01\$001	43282	15,66	0	56,99	
TMTA0254-0070-B01-01\$001	17115	24,29	23,32	69,83	x
TMTA0254-0071-B01-05\$001	41360	17,06	16,02	76,96	x
TMTA0254-0080-B02-03\$001	29495	12,81	0	47,2	
TMTA0254-0082-B01-01\$001	40045	15,96	0	51,4	
TMTA0254-0087-B01-01\$001	40672	18,24	0	76,34	x
TMTA0254-0105-B01-02\$001	42879	22,12	21,27	47,7	
TMTA0254-0110-B01-01\$001	42238	20,13	0	75,73	x
TMTA0254-0111-B01-01\$001	42935	45,59	24,6	51,26	x
TMTA0254-0120-B01-01\$001	36683	18,94	18,13	51,47	
TMTA0254-0120-B01-07\$001	39382	17,6	16,9	51,12	
TMTA0254-0132-B01-03\$001	39999	38,98	37,3	54,96	x
TMTA0254-0139-B01-03\$001	43059	41,63	31,03	35,57	
TMTA0255-0073-B01-01\$001	42027	13,74	0	81,48	x
TMTA0255-0080-B01-01\$001	43476	63,73	36,67	26,9	x
TMTA0255-0098-B01-01\$001	48254	18,38	0	52,77	
TMTA0255-0110-B01-01\$001	38849	30,94	0,17	64,5	
TMTA0255-0112-B01-03\$001	48472	26,23	25,19	51,21	
TMTA0255-0133-B01-01\$001	1890532	23,83	23,2	24,45	
TMTA0257-0104-B01-02\$001	640098	13,8	0	62,47	
TMTA0252-0078-B02-01\$001	76441	14,87	14,17	36,79	
TMTA0252-0109-B01-01\$001	69453	21,27	20,2	72,85	
TMTA0252-0142-B01-01\$001	71863	20,43	19,62	47,18	
TMTA0252-0156-B01-02\$001	65565	15,87	0	78,3	x

TMTA0254-0177-B01-01\$001	67618	15,35	14,35	60,98	
TMTA0254-0186-B01-07\$001	67449	28,66	28,11	14,79	
TMTA0254-0187-B01-04\$001	70634	21,63	20,46	71,54	x
TMTA0255-0012-B02-03\$001	74277	19,47	18,54	52,18	
TMTA0255-0040-B01-01\$001	64076	21,02	0	74,27	x
TMTA0255-0061-B01-01\$001	69062	21,75	20,54	72,68	x
TMTA0257-0040-B01-08\$001	69229	13,99	13,37	58,78	
TMTA0257-0074-B02-01\$001	72358	11,77	11,07	70,52	
TMTA0257-0133-B01-06\$001	71008	13,93	13,35	57,74	
TMTA0257-0169-B01-02\$001	73796	4,42	4,2	90,43	x
TMTA0257-0208-B01-02\$001	65922	20,94	19,58	75,39	x
TMTA0258-0019-B01-02\$001	67969	13,19	0	38,41	
TMTA0258-0044-B01-05\$001	66375	21,75	21,26	32,46	
TMTA0258-0051-B02-02\$001	66099	13,93	13,21	80,61	x
TMTA0258-0079-B01-01\$001	68208	15,94	0	56,84	
TMTA0258-0084-B01-04\$001	32557	21,81	20,68	70,33	x
TMTA0258-0105-B01-01\$001	70097	18,99	18,09	73,83	x
TMTA0258-0111-B02-03\$001	66455	29,7	28,29	65,05	x
TMTA0258-0161-B01-01\$001	69256	22,16	20,87	71	x
TMTA0258-0166-B01-07\$001	69820	21,65	20,31	72,56	x
TMTA0258-0170-B02-05\$001	74311	13,72	0	69,3	

Пример 4: Зависимое от гомологии точное редактирование генов для введения мутации A2004V в ген ацетил-КоА карбоксилазы аллогексаплоидной пшеницы с помощью нуклеазы Cas9.

Используя нуклеазу Cas9 и комбинацию гРНК/донорной ДНК, прошедшую предварительный скрининг на ее способность к потенциальному HR-опосредованному точному редактированию генов в аллогексаплоидной пшенице, как описано в примере 1, мы восстановили отредактированные растения пшеницы, имеющие желаемую аминокислотную замену A2004V в одном или нескольких аллелях гена ацетил-КоА карбоксилазы, с помощью HR-опосредованного донора целевого разрыва двухцепочечной ДНК и посредством непрямой селекции на устойчивость к PPT. Вектор сгРНК pBAY02524 (SEQ ID NO: 10) содержит кассету

для экспрессии гРНК, которая направляет нуклеазу Cas9 для создания разрыва двухцепочечной ДНК в последовательности TSTTCCTCGTGCTGGGCAAGTC-TGG (SEQ ID NO: 55) целевого сайта TS, расположенной непосредственно перед кодоном-мишенью GCT. Донорная ДНК pBAY02536 (SEQ ID NO: 16) была разработана для введения 2 замен оснований в кодоне-мишени (GCT на GTC), что привело к изменению A2004 на уровне белка. Донорная ДНК включает фрагмент ДНК размером 787 п.о. *Triticum aestivum*, субгеном В сорта Fielder, ген ацетил-КоА карбоксилазы, содержащий желаемую мутацию (замена A2004V). Донорная ДНК также содержит некоторые другие молчащие мутации, чтобы предотвратить дробление донорной ДНК и отредактированного аллеля с желаемой мутацией (A2004V). Сердцевинная последовательность из 3 п.о. (GTC) в донорной ДНК была фланкирована левым и правым гомологичными плечами длиной около 390 п.о., которые идентичны последовательностям ацетил-КоА карбоксилазы дикого типа субгенома В.

Незрелые зародыши размером 2-3 мм отделяли от стерилизованных колосьев пшеницы сорта Fielder и бомбардировали с использованием системы доставки частиц PDS-1000/He в соответствии с описанием в Sparks and Jones (Cereal Genomics: Methods in Molecular biology, том 1099, глава 17). Плазмидную ДНК векторов pBAY02430 (нуклеаза Cas9) (SEQ ID NO: 1), pBAY02524 (гРНК) (SEQ ID NO: 10), pBAY02536 (донорная ДНК) (SEQ ID NO: 16) смешали с плазмидой pIB26 (SEQ ID NO: 18). Вектор pIB26 (SEQ ID NO: 18) содержит слитый ген *egfp-bar* под контролем промотора 35S. Незрелые эмбрионы, подвергшиеся бомбардировке, поместили в неселективную среду для индукции каллуса на 1-2 недели, затем переместили в среду для селекции, содержащую PPT, после чего устойчивые к PPT каллусы отбирали и переносили в среду для регенерации для образования побегов, как описано в документе Ishida et al. (Агробактериальные протоколы: том 1, Методы молекулярной биологии, 1223, глава 15).

Все растения, которые развились из одного незрелого зародыша, рассматривали как единый пул. Геномную ДНК экстрагировали из объединенных в пул образцов листьев и сконструировали набор праймеров (HT-18-101 Forward (SEQ ID NO: 25)/ HT-18-102 Reverse (SEQ ID NO: 26)) для специфической амплификации отредактированного гена ацетил-КоА карбоксилазы. Проростки в составе пула, которые дали ожидаемый ПЦР-фрагмент в этой специфической ПЦР

1-го редактирования, затем переносили в отдельные пробирки и дополнительно анализировали посредством выполнения ПЦР с использованием набора праймеров HT-18-101 Forward (SEQ ID NO: 25)/ HT-18-102 Reverse (SEQ ID NO: 26) и путем глубокого секвенирования. Всего в 4 экспериментах бомбардировали 382, 424, 401 и 375 эмбрионов смесью плазмид ДНК pBAY02430 (нуклеаза Cas9) (SEQ ID NO: 1), pBAY02524 (rPHK1) (SEQ ID NO: 10), pBAY02536 (донорная ДНК-1) (SEQ ID NO: 16) и pIB26 (SEQ ID NO: 18). В рамках этих 4 экспериментов устойчивые к фосфинотрицину (PPT) регенерирующие каллусы побегов были получены из в общей сложности 107, 326, 341 и 300 незрелых эмбрионов. Специфическая амплификация отредактированного гена ацетил-КоА карбоксилазы наблюдалась в 2, 28, 7 и 5 объединенных в пул образцах листьев. Специфическая ПЦР 2-го редактирования была проведена в общей сложности на 14, 259, 29 и 40 отдельных растениях, полученных из 2, 27, 6 и 5 пулов проростков, оцененных как положительные в результате ПЦР 1-го редактирования, и специфическая амплификация отредактированного гена ацетил-КоА карбоксилазы наблюдалась в 7, 58, 7 и 7 отдельных проростках, полученных из, соответственно, 2, 23, 3 и 6 пулов проростков (Таблица 8). Поскольку каждый пул проростков был получен из одного незрелого зародыша, все проростки, полученные из одного незрелого зародыша (пул проростков), рассматриваются как независимое отредактированное событие, хотя здесь нельзя исключить, что может быть несколько независимых отредактированных событий между отдельными побегами, полученными от одного незрелого эмбриона, оцененного как положительный по результатам ПЦР 2-го редактирования. На растениях из независимых событий, оцененных как положительные по результатам ПЦР 2-го редактирования, проводили глубокое секвенирование. Для 1-й ПЦР использовали пару праймеров HT-18-101 (SEQ ID NO: 25)/ HT-18-110 (SEQ ID NO: 27). Эти праймеры были расположены за пределами гомологических плеч донорной ДНК для амплификации фрагмента длиной 1313 п.о. Для вложенной ПЦР с целью амплификации области размером в 348 п.о. для секвенирования следующего поколения использовали пару праймеров HT-18-051 (SEQ ID NO: 20)/ HT-18-054 (SEQ ID NO: 22). Эти данные показали, что нам удалось восстановить растения с одним или двумя аллелями, точно отредактированными с желаемой аминокислотной заменой A2004V (Таблица 9).

Таблица 8.

№	Кол-во бомбардированных эмбрионов	Каллусы, регенерирующие побеги PPT ^R	Кол-во положительных пулов листьев в ПЦР 1-го редактирования	Кол-во проростков, проверенных в ходе ПЦР 2-го редактирования (полученные из кол-ва пулов листьев*)	Кол-во отдельных проростков, признанных положительными по результатам ПЦР 2-го редактирования (полученные из кол-ва пулов листьев*)
1	382	107	2	14 (2)	7(2)
2	424	326	28	259 (27)	58(23)
3	401	341	7	29 (6)	7(3)
4	375	300	5	40 (5)	7(3)

Таблица 9. Процент (%) точно отредактированных прочтений в целевом локусе ацетил-КоА-карбоксилазы (ACCCase A2004V) в отдельных проростках из независимых событий, оцененных как положительные по результатам ПЦР 2-го редактирования

Событие	Секвенирование следующего поколения на отдельных побегах из независимых событий, признанных положительными по результатам ПЦР 2-го редактирования		
	Целевое прочтение	Процент отредактированных прочтений	Процент прочтений дикого типа
TMTA0166-0005-B01-06\$001	55817	10,79	0,09
TMTA0170-0097-B01-07\$001	51820	16,32	51,08
TMTA0170-0118-B01-09\$001	54705	14,06	0,08
TMTA0170-0119-B01-02\$001	48846	18,39	0,15
TMTA0166-0134-B01-02\$001	52468	16,34	32,31
TMTA0167-0135-B01-05\$001	56139	14,72	13,36
TMTA0167-0150-B01-01\$001	53638	14,27	13,11
TMTA0167-0152-B01-08\$001	47913	40,21	0,04
TMTA0167-0164-B01-05\$001	44855	13,76	10,3
TMTA0167-0163-B01-04\$001	56177	15,62	39,62

TMТА0167-0247-B01-03\$001	53868	19,72	33,08
TMТА0167-0235-B01-01\$001	48851	9,16	63,89
TMТА0167-0100-B01-04\$001	59993	12,71	48,52
TMТА0167-0188-B01-02\$001	53936	13,45	17,07
TMТА0167-0124-B01-09\$001	55733	2,97	67,63
TMТА0167-0140-B01-02\$001	51273	1,93	77,74
TMТА0167-0102-B01-03\$001	57154	24,86	31,89
TMТА0167-0211-B01-02\$001	51305	64,06	0,01
TMТА0167-0191-B01-09\$001	56996	22,33	26,19
TMТА0167-0214-B01-08\$001	42659	14,99	37,49
TMТА0167-0213-B01-01\$001	59588	10,25	23,7

Пример 5: Зависимое от гомологии точное редактирование генов для введения мутации ALSW548L в ген ацетолактатсинтазы (ALS) аллогексаплоидной пшеницы с помощью нуклеазы Cas9.

Используя нуклеазу Cas9 и комбинацию гРНК/донорной ДНК, прошедшую предварительный скрининг на ее способность к потенциальному HR-опосредованному точному редактированию генов в аллогексаплоидной пшенице, как описано в примере 3, мы восстановили отредактированные растения пшеницы, имеющие желаемую аминокислотную замену W548L в одном или нескольких аллелях гена ацетолактатсинтазы, с помощью HR-опосредованного донора целевого разрыва двухцепочечной ДНК и посредством непрямой селекции на устойчивость к PPT. Нами было выявлено 2 подходящих вектора сгРНК. Векторы сгРНК pBAY02524 pBAY02533 (SEQ ID NO: 11) и pBAY02535 (SEQ ID NO: 12) содержат кассету для экспрессии гРНК, которая направляет нуклеазу Cas9 для создания разрыва двухцепочечной ДНК в последовательностях целевого сайта TS GAACAACCAGCATCTGGGAA-TGG (SEQ ID NO: 56) и ATCTGGGAATGGTGGTGCAG-TGG (SEQ ID NO: 57), соответственно. Донорная ДНК pBAY02542 (SEQ ID NO: 17) была разработана для введения 2 замен оснований в кодоне-мишени (TGG на CTC), что привело к изменению W548L на уровне белка. Донорная ДНК включает фрагмент ДНК размером 803 п.о. *Triticum aestivum*, субгеном D сорта Fielder, ген ацетолактатсинтазы, содержащий желаемую мутацию (замена W548L). Донорная ДНК также содержит некоторые

другие молчащие мутации, чтобы предотвратить дробление донорной ДНК и отредактированного аллеля с желаемой мутацией (W548L). Сердцевинная последовательность из 3 п.о. (СТС) в донорной ДНК была фланкирована левым и правым гомологичными плечами длиной около 400 п.о., которые идентичны последовательностям ацетолактатсинтазы дикого типа субгенома D.

Незрелые зародыши размером 2-3 мм отделяли от стерилизованных колосьев пшеницы сорта Fielder и бомбардировали с использованием системы доставки частиц PDS-1000/He в соответствии с описанием в Sparks and Jones (Cereal Genomics: Methods in Molecular biology, том 1099, глава 17). Плазмидную ДНК векторов pBAY02430 (нуклеаза Cas9) (SEQ ID NO: 1), pBAY02533 (гРНК) (SEQ ID NO: 11) или pBAY02535 (гРНК) (SEQ ID NO: 12), pBAY02542 (донорная ДНК) (SEQ ID NO: 17) смешали с плазмидой pIB26 (SEQ ID NO: 18). Вектор pIB26 (SEQ ID NO: 18) содержит слитый ген *egfp-bar* под контролем промотора 35S. Незрелые эмбрионы, подвергшиеся бомбардировке, поместили в неселективную среду для индукции каллуса на 1-2 недели, затем переместили в среду для селекции, содержащую PPT, после чего устойчивые к PPT каллусы отбирали и переносили в среду для регенерации для образования побегов, как описано в документе Ishida et al. (Агробактериальные протоколы: том 1, Методы молекулярной биологии, 1223, глава 15).

Все растения, которые развились из одного незрелого зародыша, рассматривали как единый пул. Геномную ДНК экстрагировали из объединенных в пул образцов листьев и сконструировали набор праймеров (HT-18-135 Forward (SEQ ID NO: 32) / HT-18-136 Reverse (SEQ ID NO: 33)) для специфической амплификации отредактированного гена ацетолактатсинтазы. Проростки в составе пула, которые дали ожидаемый ПЦР-фрагмент в этой специфической ПЦР 1-го редактирования, затем переносили в отдельные пробирки и дополнительно анализировали посредством выполнения ПЦР с использованием пары праймеров HT-18-135 Forward (SEQ ID NO: 32) / HT-18-136 Reverse (SEQ ID NO: 33) и путем глубокого секвенирования. Всего в 4 экспериментах бомбардировали 325, 467, 385 и 339 эмбрионов смесью ДНК плазмид pBAY02430 (нуклеаза Cas9) (SEQ ID NO: 1), pBAY02533 (гРНК) (SEQ ID NO: 11) или pBAY02535 (SEQ ID NO: 12) и pBAY02542 (донорная ДНК) (SEQ ID NO: 17) и pIB26 (SEQ ID NO: 18). В рамках этих 4 экспериментов устойчивые к фосфинотрицину (PPT) регенерирующие каллусы побегов были получены из в общей сложности, соответственно, 235, около

258, 112 и 164 незрелых эмбрионов. Специфическая амплификация отредактированного гена ацетолактатсинтазы наблюдалась в 10, 11, 3 и 4 объединенных в пул образцах листьев. Специфическая ПЦР 10-го редактирования была проведена в общей сложности на 53, 71, 27 и 13 отдельных растениях, полученных из 10, 11, 3 и 3 пулов проростков, оцененных как положительные в результате ПЦР 1-го редактирования, и специфическая амплификация отредактированного гена ацетолактатсинтазы наблюдалась в 14, 25, 12 и 4 отдельных проростках, полученных из, соответственно, 4, 7, 3 и 2 пулов проростков (Таблица 10). На ряде растений из независимых событий, оцененных как положительные по результатам ПЦР 2-го редактирования, проводили глубокое секвенирование. Для 1-й ПЦР использовали пару праймеров HT-18-130 (SEQ ID NO: 31) / HT-18-136 (SEQ ID NO: 33). Эти праймеры были расположены за пределами гомологических плеч донорной ДНК для амплификации фрагмента длиной 1278 п.о. Для вложенной ПЦР с целью амплификации области размером в 320 п.о. для секвенирования следующего поколения использовали пару праймеров HT-18-065 (SEQ ID NO: 23)/ HT-18-066 (SEQ ID NO: 24). Эти данные показали, что нам удалось восстановить растения с одним или двумя аллелями, точно отредактированными с желаемой аминокислотной заменой W548L. Проростки с процентом точного редактирования ниже 10% считаются химерными (например, ТМТА0158-0107-B01-01\$001, ТМТА0183-0055-B01-01\$001) (Таблица 11).

Таблица 10. Количество отредактированных проростков ацетолактатсинтазы W548L исходя из результатов редактирования анализа ПЦР

Пример №	Кол-во бомбардированных эмбрионов	Каллусы, регенерирующие побеги PPT ^R	Кол-во положительных пулов листьев в ПЦР 1-го редактирования	Кол-во проростков, проверенных в ходе ПЦР 2-го редактирования (полученные из кол-ва пулов листьев*)	Кол-во отдельных проростков, признанных положительным по результатам ПЦР 2-го редактирования (полученные из кол-ва пулов листьев*)
1	325	~285	10	53 (10)	14(4)
2	467	~308	11	71 (11)	35 (7)
3	385	112	3	27(3)	12(3)
4	339	164	4	13(3)	4(2)

Таблица 11. Процент (%) точно отредактированных прочтений в гене ацетолактатсинтазы (ALS W548L) в отдельных проростках из независимых событий, оцененных как положительные по результатам ПЦР 2-го редактирования

Событие	Секвенирование следующего поколения на отдельных побегах из независимых событий, признанных положительными по результатам ПЦР 2-го редактирования		
	Целевое прочтение	Процент отредактированных прочтений	Процент прочтений дикого типа
TMTA0158-0107-B01-01\$001	50207	3,95	60,56
TMTA0180-0050-B01-06\$001	53374	21,69	0
TMTA0176-0033-B01-04\$001	57042	21,09	0
TMTA0176-0032-B01-01\$001	52353	21,71	0
TMTA0176-0031-B01-01\$001	43073	21,7	0
TMTA0176-0225-B01-01\$001	49785	22,72	0,01
TMTA0176-0279-B01-01\$001	47708	11,02	0
TMTA0183-0055-B01-01\$001	23655	5,86	0

Пример 6: Зависимое от гомологии точное редактирование генов для введения мутации I1781L в ген ацетил-КоА карбоксилазы аллогексаплоидной пшеницы с помощью нуклеазы Cas9 и прямой селекции.

Бомбардированные незрелые эмбрионы, подверглись бомбардировке смесью плазмидной ДНК pBAY02430 (Cas9) (SEQ ID NO: 1), pBAY02528 (гРНК) (SEQ ID NO: 5) и донорной ДНК pBAY02539 (SEQ ID NO: 13) для внедрения мутации I1781L в ген ацетил-КоА карбоксилазы. Незрелые эмбрионы, подвергшиеся бомбардировке, поместили в неселективную среду для индукции каллюса на 1-2 недели, затем переместили в среду, содержащую 200 и 300 нМ хизалофоп. С использованием пары праймеров HT-18-111 Forward (SEQ ID NO: 28) / HT-18-112 Reverse (SEQ ID NO: 29) были восстановлены устойчивые к хизалофопу линии, которые являлись положительными в ПЦР, специфичной для редактирования. На ряде растений из независимых событий, оцененных как положительные по результатам ПЦР 2-го редактирования, проводили глубокое секвенирование. Эти данные секвенирования следующего поколения дополнительно подтверждают, что эти растения содержат один или более точно отредактированных аллелей с желаемой аминокислотной заменой I1781L.

Пример 7: Зависимое от гомологии точное редактирование генов для введения мутации I1781L в ген ацетил-КоА карбоксилазы аллогексаплоидной пшеницы путем рибонуклеопротеин-опосредованной доставки компонентов CRISPR/Cas9

Для создания рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 белок Cas9 (нуклеаза Alt-R® S.p. Cas9 V3, IDT) и сгРНК (кРРНК Alt-R® CRISPR-Cas9 XT и тракрРНК Alt-R® CRISPR-Cas9, IDT) предварительно смешали в соответствии с протоколом IDT (www.idtdna.com). Эта сгРНК была разработана для нацеливания на последовательность CTAGGTGTGGAGAACATACA-TGG (SEQ ID NO: 50), расположенную над кодоном-мишенью в ацетил-КоА карбоксилазе.

Незрелые эмбрионы размером 2-3 мм бомбардировали смесью рибонуклеопротеина и донорной ДНК pBay02539 (SEQ ID NO: 13) с использованием системы доставки частиц PDS-1000/He согласно описанию в работе Svitashv et al. 2016. Незрелые эмбрионы, подвергшиеся бомбардировке, поместили в неселективную среду для индукции каллюса на 2 недели, затем переместили в селективную среду, содержащую 200 нМ хизалофоп. Всего в 2 экспериментах 298 и 302 эмбриона бомбардировали смесью рибонуклеопротеина и донорной ДНК pBAY02539 (SEQ ID NO: 13). Из этих 2 экспериментов были получены толерантные к хизалофопу линии из 16 и 9 незрелых эмбрионов, и для этих 25 линий наблюдалось специфическая амплификации отредактированного гена ацетил-КоА карбоксилазы с использованием пары праймеров HT-18-111 Forward (SEQ ID NO: 28)/HT-18-112 Reverse (SEQ ID NO : 29).

По 9 независимым событиям, оцененным как положительные по результатам ПЦР с редактированием, на 1 растении / событии проводили глубокое секвенирование. Область, окружающую предполагаемый целевой сайт, амплифицировали методом ПЦР с полимеразой высокого качества Q5 (M0492L) с помощью вложенной ПЦР. Для 1-й ПЦР использовали пару праймеров HT-18-162 (SEQ ID NO: 34)/HT-18-112 (SEQ ID NO: 29). Эти праймеры были расположены за пределами гомологических плеч донорной ДНК для амплификации фрагмента длиной 1736 п.о. Для вложенной ПЦР с целью амплификации области размером в 386 п.о. для секвенирования следующего поколения использовали пару праймеров HT-18-048 (SEQ ID NO: 19)/HT-18-053 (SEQ ID NO: 21). Мы оценили частоту редактирования, рассчитав процент прочтений последовательности,

демонстрирующих наличие желаемых мутаций с аминокислотной заменой (ацетил-КоА карбоксилаза I1781L) в кодоне-мишени, как указано донорной ДНК, в виде доли от общего числа прочтений. Эти данные показали, что нам удалось восстановить растения аллелями в количестве от одного до трех, точно отредактированными с желаемой аминокислотной заменой I1781L (Таблица 12).

Таблица 12. Процент (%) точно отредактированных прочтений в целевом локусе ацетил-КоА-карбоксилазы (ACCase I1781L) в отдельных проростках из независимых событий, оцененных как положительные по результатам ПЦР 2-го редактирования

Событие	Секвенирование следующего поколения на отдельных побегах из независимых событий, признанных положительными по результатам ПЦР 2-го редактирования		
	Целевые прочтения	Процент отредактированных прочтений	Процент прочтений дикого типа
TMTA0406-0002-B01-05\$001	32333	20,15	71,48
TMTA0406-0005-B01-02\$001	24434	41,73	0
TMTA0407-0002-B01-02\$001	34153	35,65	18,29
TMTA0407-0004-B01-06\$001	29263	20,05	16,86
TMTA0407-0008-B01-06\$001	30420	18,72	29,71
TMTA0407-0015-B01-07\$001	23696	34,95	37,07
TMTA0407-0018-B01-03\$001	24723	23,44	0
TMTA0407-0026-B01-01\$001	28637	18,92	29,05
TMTA0407-0027-B01-02\$001	29306	20,59	60,67

Пример 8: Зависимое от гомологии точное редактирование генов для введения мутации I1781L в ген ацетил-КоА карбоксилазы аллогексаплоидной пшеницы с использованием парной никазы Cas9 путем рибонуклеопротеин-опосредованной доставки компонентов CRISPR/Cas9.

Для создания рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 никазы белок никазы Cas9 (никаза Alt-R® S.p. Cas9 V3, IDT) и crPHK (крPHK Alt-R® CRISPR-Cas9 XT и тракрPHK Alt-R® CRISPR-Cas9, IDT) предварительно смешали в соответствии с протоколом IDT (www.idtdna.com). В рамках этого крPHK1 была предназначена для нацеливания на последовательность STAGGTGTGGAGAACATACA-TGG (TS1) (SEQ ID NO: 50), а крPHK2 была предназначена для нацеливания на последовательность-мишень

СТССТСАТАГГСССТАГААТ-АГГ (TS2) (SEQ ID NO: 53), которые расположены на противоположных цепочках с расстоянием 32 нуклеотидов между двумя сайтами разрывов.

Незрелые эмбрионы размером 2-3 мм бомбардировали смесью РНП1, нацеленного на TS1 и РНП2, нацеленного на TS2 в соотношении 1:1 вместе с донорной ДНК pBay02540 (SEQ ID NO: 14) с использованием системы доставки частиц PDS-1000/He согласно описанию в работе Svitashv et al. 2016. Незрелые эмбрионы, подвергшиеся бомбардировке, поместили в неселективную среду для индукции каллюса на 2 недели, затем переместили в селективную среду, содержащую 200 нМ хизалофоп. Устойчивые к хизанофопу растения далее подвергли анализу по ПЦР с использованием набора праймеров (НТ-18-112 / НТ-18-113) (SEQ ID NO: 29; 30) для специфической амплификации отредактированного гена ацетил-КоА карбоксилазы. На растениях, оцененных как положительные по результатам ПЦР с редактированием, проводили глубокое секвенирование. Для глубокого секвенирования область, окружающую предполагаемый целевой сайт, амплифицировали методом ПЦР с полимеразой высокого качества Q5 (M0492L) с помощью вложенной ПЦР. Для 1-й ПЦР использовали пару праймеров НТ-18-162 НТ-18-112 (SEQ ID NO 34; 29). Эти праймеры были расположены за пределами гомологических плеч донорной ДНК. Для вложенной ПЦР использовали пару праймеров НТ-18-048/ НТ-18-053 (SEQ ID NO: 19; 21).

Эти данные указывают на, что практически во всех растениях, содержащих аллель(и) с желаемым редактированием (P1781L), не было аллелей с инсерционно-делеционными мутациями, полученными из-за нехомологичного соединения концов (Таблица 13).

Таблица 13. Процент (%) точно отредактированных прочтений в целевом локусе ацетил-КоА-карбоксилазы (ACCase I1781L) в растениях, устойчивых к хизалофопу, отредактированных спаренной никазой Cas9, доставляемой в виде РНП

Растение	Секвенирование следующего поколения			нет аллелей с инсерционно-делеционными мутациями	Кол-во аллелей с инсерционно-делеционной мутацией
	Целевые прочтения	Процент редактированных I1781L	Процент дикого типа		
TMTA0496-0002-B01-05\$001	18598	17,47	77,87	x	0
TMTA0496-0002-B01-06\$001	20550	17,24	78,09	x	0
TMTA0497-0049-B01-01\$001	21083	21,04	74,15	x	0
TMTA0497-0164-B01-02\$001	24065	16,76	78,35	x	0
TMTA0497-0164-B01-05\$001	20158	17,04	77,98	x	0
TMTA0497-0164-B01-14\$001	21306	10,96	83,58	x	0
TMTA0497-0164-B01-16\$001	25632	16,97	78,4	x	0
TMTA0498-0001-B01-01\$001	23001	14,84	80,44	x	0
TMTA0498-0001-B01-02\$001	21526	16,97	78,2	x	0
TMTA0543-0010-B01-02	121507	14,24	45,75		1

Пример 9: Зависимое от гомологии точное редактирование генов для введения мутации I1781L в ген ацетил-КоА карбоксилазы аллогексаплоидной пшеницы с помощью спаренной никазы Cas9 при более крупных расстояниях между одноцепочечными разрывами.

Для этого эксперимента разработаны гРНК, направляющие никазу SpCas9 к целевым сайтам на противоположных цепях с расстоянием в 45 или 136 нуклеотидов между двумя сайтами одноцепочечных разрывов. Незрелые эмбрионы подвергали совместной бомбардировке вектором никазы Cas9 pBas02734 (SEQ ID NO: 3), донорной ДНК pBas04096 (SEQ ID NO: 35) и парой векторов гРНК pBay02528 (SEQ ID NO: 5). и pBas04093 (SEQ ID NO: 37) для создания

одноцепочечного разрыва на противоположных цепях на расстоянии 136 нуклеотидов друг от друга, или же эмбрионы подвергали совместной бомбардировке вектором никазой Cas9 pBas02734 (SEQ ID NO: 3), донорной ДНК pBay02544 (SEQ ID NO: 36) и парой векторов гРНК pBay02529 (SEQ ID NO: 6) и pBay02531 (SEQ ID NO: 8), каждая из которых создает одноцепочечный разрыв на противоположных цепях на расстоянии 45 нуклеотидов друг от друга. После бомбардировки незрелые эмбрионы поместили в неселективную среду для индукции каллюса на 2 недели, затем переместили в селективную среду, содержащую 200 нМ хизалофоп. Устойчивые к хизанофопу растения далее подвергли анализу по ПЦР с использованием набора праймеров (HT-18-113 Forward / HT-18-112 Reverse) (SEQ ID NO: 30; 29) для специфической амплификации отредактированного гена ацетил-КоА карбоксилазы. На растениях, оцененных как положительные по результатам ПЦР с редактированием, проводили глубокое секвенирование. Для глубокого секвенирования область, окружающую предполагаемый целевой сайт, амплифицировали методом ПЦР с полимеразой высокого качества Q5 (M0492L) с помощью вложенной ПЦР. Для 1-й ПЦР использовали пару праймеров HT-18-162 HT-18-112 (SEQ ID NO 34; 29). Эти праймеры были расположены за пределами гомологических плеч донорной ДНК для амплификации фрагмента длиной 1736 п.о. Для вложенной ПЦР использовали пару праймеров 18-048/ HT-18-053 (SEQ ID NO: 19; 21). Эти данные в таблице 14 показали, что даже при больших расстояниях между одноцепочечными разрывами можно идентифицировать растения с одним точно отредактированным аллелем, не содержащие аллелей с инсерционно-делеционными мутациями, полученными из-за негомологического соединения концов.

Таблица 14. Процент (%) точно отредактированных прочтений в целевом локусе ацетил-КоА-карбоксилазы (ACCase I1781L) в растениях, устойчивых к хизалофопу, отредактированных спаренной никазой Cas9

Растение	Расстояние между одноцепочечными разрывами	Целевые прочтения	Процент редактирований I1781L	Процент дикого типа	Кол-во аллелей с инсерционно-делеционной мутацией
TMTA0279-0117-B01-01	45 nt	75258	24,19	73,29	0

TMTA0279-0128-B01-01	45 nt	79808	13,22	37,31	3
TMTA0280-0153-B01-01	45 nt	76765	19,71	78,05	0
TMTA0654-0022-B01-02	136 nt	122904	16,59	77,96	0
TMTA0654-0022-B01-03	136 nt	112145	18,06	75,84	0

Пример 10: Зависимое от гомологии точное редактирование генов для введения мутации TIPS в ген 5-энолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазы в рисе.

В следующих примерах описано зависимое от гомологии точное редактирование генов парной никазой для введения мутации T173I и P177S в ген 5-энолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазы риса посевного, что обеспечивает аминокислотные замены TIPS, придающие устойчивость к глифосату. С использованием оптимизированного на уровне кодонов риса варианта никазы Cas9 (D10A) (pKVA824 (SEQ ID NO: 43)) и 2 гРНК (pKVA766 (SEQ ID NO: 45)) и pKVA769 (SEQ ID NO: 46)), а также донорной ДНК (pKVA791 (SEQ ID NO: 47)), в целевые кодоны можно было ввести желаемые мутации. Две сгРНК были разработаны для создания формирования 3'-липких концов ДНК на 33 п.о., охватывающих целевой кодон. Векторы сгРНК pKVA766 и pKVA769 направляют никазу SpCas9 к сайтам-мишеням TS1 (5'-CCA-TTGACAGCAGCCGTGACTGC-3') (SEQ ID NO: 58) и, соответственно, TS2 (5'-GAGGAAGTGCAACTCTTCTTG-GGG 3') (SEQ ID NO: 59). Последовательность экзона 2 в донорной плазмиде pKVA791 содержала замены TIPS аминокислотных нуклеотидов C518T и C529T и молчащую мутацию A531G для создания уникального сайта рестрикции PvuI. Эмбриогенный каллус риса, полученный из зрелых семян, использовали в качестве исходного материала для бомбардировки частицами. Эмбриогенный каллус бомбардировали с использованием системы подачи частиц (СПЧ) (Grayel). Параметры бомбардировки были приняты следующими: диаметр частиц золота 0,6 мкм, расстояние до мишени 17 см, давление бомбардировки 500 кПа, и для каждой плазмидной ДНК (Cas9, гРНК, донорная ДНК) использовали 1,25 мкг ДНК на одну дозу. После бомбардировки кусочки каллуса помещали в неселективную среду индукции каллуса RSK500 (соли SK-1m Duchefa (Khanna & Raina, 1998, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52: 145-153), витамины Khanna (Khanna & Raina, выше),

L-пролин 1,16 г/л, CuSO₄*5H₂O 2,5 мг/л, 2,4-D 2 мг/л, мальтоза 20 г/л, сорбит 30 г/л, сольват 0,5 г/л, агароза 6 г/л, рН 5,8) на несколько дней, после чего переносили в среду RSK500 с добавлением 150 мг/л глифосата. Побег регенерировали из активно растущих эмбрионных линий каллусных клеток, устойчивых к глифосату.

Расщепление рестриктами (PvuI) амплифицированного продукта ПЦР над целевой областью устойчивых к глифосату событий было выполнено в качестве первого молекулярного скрининга для подтверждения введения мутации TIPS в нативный ген *epsps*. Молчащая мутация для создания сайта PvuI была введена рядом с мутацией TIPS в донорной ДНК, чтобы облегчить молекулярный скрининг для идентификации отредактированных событий TIPS. По результатам расщепления PvuI амплифицированного продукта ПЦР из 24 событий *gylT* выявлено 13 моноаллельных событий с мутациями TIPS, 10 биаллельных событий с мутациями TIPS, и 1 событие без мутации TIPS. Анализ секвенирования биаллельных событий подтвердил наличие мутации TIPS в обоих аллелях. Секвенирование клонированных продуктов ПЦР, полученных из 13 моноаллельных отредактированных событий, полученных с помощью парной никазы, показало, что 10 из этих событий были моноаллельными с мутацией TIPS, в рамках которых один аллель был точно отредактирован мутацией TIPS, а один аллель был диким (мутация TIPS/дикий). Другие 3 события также имели точно отредактированный аллель с мутацией TIPS, но в другом аллеле (мутация TIPS/инсерционно-делеционная мутация) мутация была неспецифической (инсерционно-делеционная) (Фиг. 1).

Секвенирование клонированных продуктов ПЦР из 23 моноаллельных отредактированных событий с мутацией TIPS, полученных путем совместной доставки нуклеазы Cas9 (pKVA790 (SEQ ID NO: 48)), одиночной sgRNA (pKVA766 (SEQ ID NO: 45)) и репарации ДНК (pKVA761 (SEQ ID NO: 60)) вместо парной никазы Cas9, как описано выше, показало, что все эти 23 события с одним аллелем, точно отредактированным с помощью мутации TIPS, также содержали аллель с инсерционно-делеционной мутацией (мутация TIPS/инсерционно-делеционная мутация) (рис. 1). Эти данные продемонстрировали, что при использовании парной никазы вместо нуклеазы количество событий (мутация TIPS/дикий тип) увеличивается, а количество событий (мутация TIPS/инсерционно-делеционная мутация) уменьшается.

Формула изобретения

1. Способ введения, по меньшей мере, одной молекулы донорной ДНК в, по меньшей мере, одну целевую область генома клетки растения, включающий следующие этапы:

- a. введение в указанную клетку растения
 - i. молекулы донорной ДНК и
 - ii. по меньшей мере, одной РНК-управляемой никазы и
 - iii. по меньшей мере, двух сгРНК или, по меньшей мере, двух крРНК и тракрРНК и
- b. инкубирование клетки растения для введения указанной, по меньшей мере, одной донорной ДНК в, по меньшей мере, одну указанную целевую область генома и
- c. выбор клетки растения, содержащей последовательность молекулы донорной ДНК в указанной целевой области,

отличающейся тем, что никазы создают, по меньшей мере, два одноцепочечных разрыва на противоположных цепях в целевом сайте геномной ДНК клетки растения, и причем эти одноцепочечные разрывы отстоят друг от друга, по меньшей мере, на 20 оснований.

2. Способ получения растения, содержащего донорную ДНК, включающий следующие этапы:

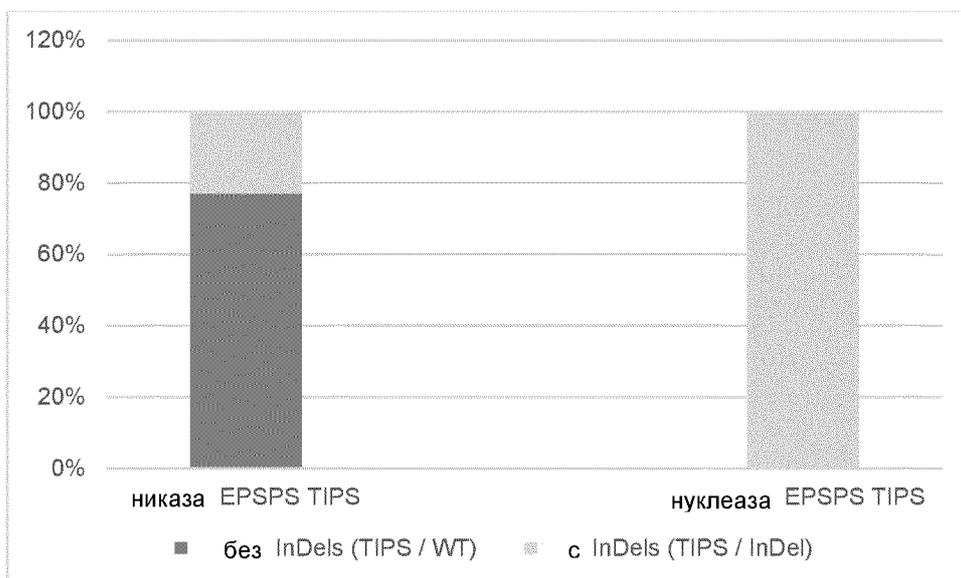
- a. введение в клетку указанного растения
 - i. молекулы донорной ДНК и
 - ii. по меньшей мере, одной РНК-управляемой никазы и
 - iii. по меньшей мере, двух сгРНК или, по меньшей мере, двух крРНК и тракрРНК и
- b. инкубирование клетки растения для введения указанной, по меньшей мере, одной донорной ДНК в целевую область генома указанной клетки растения, и
- c. выбор клетки растения, содержащей последовательность молекулы донорной ДНК в указанной целевой области, и

- d. регенерацию растения из указанной выбранной клетки растения, **отличающийся тем**, что никаза создает, по меньшей мере, два одноцепочечных разрыва на противоположных цепях в целевом сайте геномной ДНК клетки растения, и причем эти одноцепочечные разрывы отстоят друг от друга, по меньшей мере, на 20 оснований.
3. Способ по п. 1 или 2, **отличающийся тем**, что после этапа b. клетку растения инкубируют на среде, содержащей селективный агент.
4. Способ по пп. 1 - 3, **отличающийся тем**, что РНК-управляемая никаза представляет собой никазу Cas.
5. Способ по пп. 1 - 4, **отличающийся тем**, что никаза Cas представляет собой никазу Cas9 или никазу Cas12.
6. Способ по пп. 1 - 5, **отличающийся тем**, что в указанную клетку, кодируемую молекулой нуклеиновой кислоты, вводят, по меньшей мере, одну из никаз, или сгРНК, или крРНК и тракрРНК.
7. Способ по п. 6, **отличающийся тем**, что молекула нуклеиновой кислоты представляет собой плазмиду, содержащую кассету экспрессии, кодирующую указанную никазу или сгРНК, или крРНК и тракрРНК.
8. Способ по п. 6, **отличающийся тем**, что нуклеиновая кислота представляет собой молекулу РНК.
9. Способ по пп. 6 - 8, **отличающийся тем**, что, по меньшей мере, одна никаза представляет собой последовательность, оптимизированную для экспрессии в соответствующей клетке растения.
10. Способ по пп. 1 - 5, **отличающийся тем**, что, по меньшей мере, одну из РНК-управляемых никаз или сгРНК, или крРНК и тракрРНК вводят в указанную клетку в виде рибонуклеопротеина (РНП), собранного вне указанной клетки.
11. Способ по пп. 1 - 10, **отличающийся тем**, что комбинацию донорной ДНК и крРНК/тракрРНК или сгРНК выбирают предварительно.

12. Способ по пп. 1 - 11, **отличающийся тем**, что донорную ДНК и РНК-управляемую никазу и одиночную направляющую РНК или тракрРНК и крРНК вводят в указанную клетку с использованием бомбардировки частицами или опосредованного агробактериями введения ДНК.

13. Способ по пп. 1 - 12, **отличающийся тем**, что РНК-управляемая никаза содержит клеточный сигнал внутриядерной локализации.

Фигура 1 из 1



Фигура 1: Частота событий редактирования моноаллельных TIPS рнса с аллелем с инсерционно-делеционной мутацией и без него: парные никазы Cas9 в сравнении с нуклеазой Cas9