

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046169**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.13

(21) Номер заявки
202091316

(22) Дата подачи заявки
2017.09.26

(51) Int. Cl. **C12N 15/82** (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(54) **ОБОГАЩЕННЫЙ ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТОЙ РАСТИТЕЛЬНЫЙ ОРГАНИЗМ, ИМЕЮЩИЙ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЙ FAD2, И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ**

(31) **62/438,018**

(32) **2016.12.22**

(33) **US**

(43) **2020.08.18**

(86) **PCT/KR2017/010576**

(87) **WO 2018/117377 2018.06.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТУЛДЖИН ИНКОРПОРЕЙТИД (KR)

(72) Изобретатель:
**Ким Сокджун, Ку Окджэ, Джун Мин
Хее, Ким Есылъ (KR)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) **WO-A1-2008006171**

KR-B1-101656237

PHAM, A.-T. et al., "A Novel FAD2-1 A Allele in a Soybean Plant Introduction Offers an Alternate Means to Produce Soybean Seed Oil with 85 Percent Oleic Acid Content", Theoretical and Applied Genetics, [Electronic publishing], 17 June 2011, vol. 123, no. 5, pages 793-802, See abstract

KR-A-1020080107415

KR-B1-101601868

(57) Настоящее изобретение относится к растению, содержащему подвергнутый искусственной манипуляции геном, который содержит подвергнутый манипуляции ген FAD2, в котором индуцирована инсерционно-делеционная мутация в последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-30, посредством системы CRISPR/Cas, где указанная последовательность содержит последовательность РАМ 5'-NGG-3', где N независимо представляет собой А, Т, С или G, где подвергнутый манипуляции ген FAD2 способен к нокауту гена FAD2 дикого типа, таким образом ингибируя экспрессию гена FAD2 дикого типа в растении, где указанное растение в сравнении с растением дикого типа характеризуется по меньшей мере одним фенотипом, выбранным из: (a) сниженной экспрессии белка FAD2, (b) сниженного количества РНК-транскриптов гена FAD2, (c) повышенного содержания С8-24:D1 ненасыщенной жирной кислоты и (d) сниженного содержания С8-24:D2 ненасыщенной жирной кислоты. Кроме того, настоящее изобретение предусматривает композицию и способ для получения указанного растения.

B1

046169

046169

B1

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к манипуляции с геном FAD2 или его модификации с использованием системы CRISPR-Cas для повышения содержания олеиновой кислоты в растительном организме и, в частности, к растительному организму, в котором содержание олеиновой кислоты повышено путем модификации гена FAD2 с использованием системы CRISPR-Cas, способной нацеливаться на соответствующий ген, к композиции, предназначенной для осуществления манипуляции, способной осуществлять манипуляцию с геном FAD2, и к способу ее применения.

Предшествующий уровень техники изобретения

Соевое масло является вторым по счету наиболее употребляемым пищевым маслом в мире из-за его богатства незаменимыми жирными кислотами и высокой степени использования соевого шрота в качестве побочного продукта с ежегодным производством, составляющим 45 миллионов тонн. Приблизительно 62% жирных кислот, входящих в состав соевого масла, представляют собой полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA), и 54% жирных кислот представляют собой линолеовую кислоту, а 8% жирных кислот представляют собой линоленовую кислоту. Поскольку жирные кислоты имеют две или более двойных связей, то окисление происходит легко, а масло быстро становится прогорклым, что затрудняет его хранение и распространение. (Оно плохо хранится и плохо реализуется.) Следовательно, для производства соевого масла стабильного качества, предназначенного для использования в обработке или приготовлении пищи, требуются способы предварительной обработки и очистки. Большинство производителей соевого масла поддерживают определенный уровень качества, предотвращая прогорклость путем обработки с помощью частичной гидрогенизации для добавления водорода в ненасыщенную двойную связь, при этом окисление в процессе производства легко осуществляется.

Однако частичная гидрогенизация обладает недостатком, заключающимся в получении трансжирных кислот, несущих риск для способа насыщения двойной связи ненасыщенных жирных кислот водородом. Хотя в естественном состоянии образование цис-жирных кислот является преобладающим при окислении, и поскольку трансформы являются термодинамически стабильными, трансжирные кислоты, которые являются геометрическими изомерами, не существующими в природе, образуются при гидрогенизации или переработке.

Из-за противоречий относительно риска, который несут трансжиры, в 2015 году FDA США решило исключить это частично гидрогенизированное масло, которое широко используется в процессе производства обработанных пищевых продуктов, из перечня общепризнанных безопасными (GRAS). Соответственно, американские производители продуктов питания ищут различные пищевые масла, которые могут заменить и остановить использование частично гидрогенизированных масел к 2018 году, и ожидается, что в соответствующей отрасли будет затрачено 6 миллиардов долларов США на обеспечение альтернативного пищевого масла или нового производственного процесса. Ожидается, что только в США на основании деятельности FDA спрос на частично гидрогенизированное соевое масло сократится на 9 миллионов тонн в год.

Кроме того, многие страны, такие как Европа, Корея и Япония, а также США, хорошо осведомлены о риске, который несут трансжирные кислоты, и проявляют тенденцию к убеждению людей по возможности избегать употребления его в пищу, причем в мировом масштабе в будущем регулирующие правила в отношении частично гидрогенизированного масла, очевидно, будут ужесточены. Следовательно, существует необходимость в разработке продуктов на основе пищевых масел, которые не содержат трансжирных кислот, которые могут заменить соевое масло, полученное путем частичной гидрогенизации.

Раскрытие настоящего изобретения

Технические задачи.

В интересах решения вышеописанных задач в настоящем изобретении предложено растение, содержащее подвергнутый искусственной манипуляции геном,

где подвергнутый искусственной манипуляции геном содержит подвергнутый манипуляции ген FAD2, в котором индуцирована инсерционно-делеционная мутация в последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-30, посредством системы CRISPR/Cas,

где последовательность, выбранная из SEQ ID NO: 1-30, содержит последовательность PAM 5'-NGG-3', где N независимо представляет собой A, T, C или G,

где подвергнутый манипуляции ген FAD2 способен к нокауту гена FAD2 дикого типа, таким образом ингибируя экспрессию гена FAD2 дикого типа в растении,

где растение, содержащее подвергнутый искусственной манипуляции геном, в сравнении с растением дикого типа характеризуется по меньшей мере одним фенотипом, выбранным из группы, состоящей из:

- (a) сниженной экспрессии белка FAD2;
- (b) сниженного количества РНК-транскриптов гена FAD2;
- (c) повышенного содержания C8-24:D1 ненасыщенной жирной кислоты и
- (d) сниженного содержания C8-24:D2 ненасыщенной жирной кислоты.

В предпочтительном варианте осуществления C8-24:D1 ненасыщенная жирная кислота представляет собой C16-22:D1 ненасыщенную жирную кислоту.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления C8-24:D1 ненасыщенная жирная кислота представляет собой C18:D1 ненасыщенную жирную кислоту.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления C8-24:D2 ненасыщенная жирная кислота представляет собой C16-22:D2 ненасыщенную жирную кислоту.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления C8-24:D2 ненасыщенная жирная кислота представляет собой C18:D2 ненасыщенную жирную кислоту.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления растение представляет собой сою.

В настоящем изобретении также предложена композиция для получения растения, содержащего подвергнутый искусственной манипуляции геном, которая содержит:

направляющую нуклеиновую кислоту, способную нацеливаться на ген FAD2, или

кодирующую ее последовательность нуклеиновой кислоты и

редактирующий белок или кодирующую его последовательность нуклеиновой кислоты,

где редактирующий белок представляет собой белок Cas9, полученный из *Streptococcus pyogenes*,

где направляющая нуклеиновая кислота представляет собой последовательность РНК, способную связывать целевой участок в пределах последовательности нуклеиновой кислоты гена FAD2,

где целевой участок гена содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-30.

В предпочтительном варианте осуществления композиция, предназначенная для манипуляции с геном, составлена в векторной системе на основе *Agrobacterium*.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления композиция, предназначенная для манипуляции с геном, составлена в вирусной векторной системе.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления вирусный вектор включает один или более вирусных векторов, выбранных из вируса мозаики, ретровируса, лентивируса, аденовируса, аденоассоциированного вируса (AAV), вируса осповакцины, поксвируса и вируса простого герпеса.

В настоящем изобретении также предложен способ получения растения, содержащего подвергнутый искусственной манипуляции геном, описанного выше, предусматривающий доставку композиции субъекту, где субъект представляет собой растительную клетку, семя, часть растительного организма или целый растительный организм, где композиция содержит:

направляющую нуклеиновую кислоту, способную нацеливаться на ген FAD2, или кодирующую ее последовательность нуклеиновой кислоты и редактирующий белок или кодирующую его последовательность нуклеиновой кислоты, где редактирующий белок представляет собой белок Cas9, полученный из *Streptococcus pyogenes*,

где направляющая нуклеиновая кислота представляет собой последовательность РНК, способную связывать целевой участок в пределах последовательности нуклеиновой кислоты гена FAD2,

где целевой участок гена содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-30.

В предпочтительном варианте осуществления композиция составлена в векторной системе на основе *Agrobacterium*.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления композиция составлена в вирусной векторной системе.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления вирусный вектор включает один или более вирусных векторов, выбранных из вируса мозаики, ретровируса, лентивируса, аденовируса, аденоассоциированного вируса (AAV), вируса осповакцины, поксвируса и вируса простого герпеса.

Настоящее изобретение относится к подвергнутой искусственной манипуляции системе контроля ненасыщенных жирных кислот, которая влияет на повышение содержания специфической ненасыщенной жирной кислоты. Более конкретно настоящее изобретение относится к ассоциированному с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактору, подвергнутому искусственной манипуляции, и к системе для контроля ненасыщенной жирной кислоты, которая осуществляют искусственную модификацию содержания специфической ненасыщенной жирной кислоты.

Настоящее изобретение направлено на обеспечение растительного организма с повышенным содержанием специфической ненасыщенной жирной кислоты, обеспечиваемого ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором, подвергнутому искусственной манипуляции.

Настоящее изобретение направлено на обеспечение растительного организма со сниженным содержанием специфической ненасыщенной жирной кислоты, обеспечиваемым ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором, подвергнутому искусственной манипуляции.

В иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению в настоящем изобретении представлен ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции.

В иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению в настоящем изобретении представлена подвергнутая искусственной манипуляции система контроля ненасыщенных жирных кислот.

В иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению в настоящем изобретении

представлены ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции, и продукт его экспрессии.

В иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению в настоящем изобретении представлена композиция, предназначенная для осуществления манипуляции с геном для манипуляции с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором, и способ ее использования.

В иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению в настоящем изобретении представлен способ контроля биосинтеза ненасыщенной жирной кислоты.

В иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению в настоящем изобретении представлен способ контроля типа ненасыщенной жирной кислоты и ее содержания.

В иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению в настоящем изобретении представлена композиция для контроля ненасыщенной жирной кислоты с целью контроля биосинтеза ненасыщенной жирной кислоты и/или содержания ненасыщенной жирной кислоты и к различным вариантам ее применения.

В иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения в настоящем изобретении представлены ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции, такой как FAD2, FAD3, FAD4, FAD6, FAD7 или FAD8, и/или продукт его экспрессии.

В иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению в настоящем изобретении представлена композиция, предназначенная для манипуляции с геном с целью искусственной манипуляции с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором, таким как FAD2, FAD3, FAD4, FAD6, FAD7 или FAD8.

В иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению в настоящем изобретении представлен ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции, такой как FAD2, FAD3, FAD4, FAD6, FAD7 или FAD8, и/или различные варианты применения композиции, предназначенной для манипуляции с геном с целью искусственной манипуляции.

В иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению в настоящем изобретении представлен растительный организм с повышенным или сниженным содержанием специфической ненасыщенной жирной кислоты и переработанный с его использованием продукт.

Решения технических задач.

В интересах решения этих задач в настоящем изобретении представлена система, способная обеспечивать искусственный контроль биосинтеза ненасыщенной жирной кислоты и/или содержание жирных кислот, которая включает ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции, и/или композицию, способную осуществлять искусственную манипуляцию с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором с целью контроля содержания специфической ненасыщенной жирной кислоты.

В одном иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению представлен растительный организм с повышенным содержанием специфической ненасыщенной жирной кислоты, обеспечиваемым ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, подвергнутым искусственной манипуляции.

В другом иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению представлена специфическая ненасыщенная жирная кислота, полученная из растительного организма с использованием ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, подвергнутого искусственной манипуляции.

Термин "специфическая ненасыщенная жирная кислота", используемый в настоящем документе, относится к одной или нескольким ненасыщенным жирным кислотам, выбранным из различных типов известных ненасыщенных жирных кислот, причем это может быть одна или несколько ненасыщенных жирных кислот, выбранных из системы классификации, представленной количеством атомов углерода (C) и количеством двойных связей (D), которые включены в ненасыщенные жирные кислоты, среди различных типов ненасыщенных жирных кислот. Термин "CN:DM ненасыщенная жирная кислота", используемый в настоящем документе, относится к ненасыщенной жирной кислоте, состоящей из количества N атомов углерода (C) и включающей количество M двойных связей (D). В данном случае N может представлять собой целое число от 4 до 36, а M может представлять собой целое число от 1 до 35.

Специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой C8-24:D1 ненасыщенную жирную кислоту.

Специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой C16-22:D1 ненасыщенную жирную кислоту.

Специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой C18:D1 ненасыщенную жирную кислоту.

Специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой олеиновую кислоту, элаидиновую кислоту или вакценовую кислоту.

Кроме того, специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой C8-24:D2 не-

насыщенную жирную кислоту.

Специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой C16-22:D2 ненасыщенную жирную кислоту.

Специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой C18:D2 ненасыщенную жирную кислоту.

Специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой линолевую кислоту или линоэлаидиновую кислоту.

В одном иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению в настоящем изобретении представлен ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутого искусственной манипуляции.

Термин "ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор", используемый в настоящем документе, относится ко всем фактора, непосредственно участвующим в биосинтезе ненасыщенной жирной кислоты или опосредованно влияющим на него. В данном случае фактор может представлять собой ДНК, РНК, ген, пептид, полипептид или белок. Фактор включает различные материалы, способные контролировать биосинтез ненасыщенной жирной кислоты, которые являются неприродными, то есть их подвергают искусственной манипуляции. Например, фактор может представлять собой генетически манипулируемый или модифицированный ген или белок, который экспрессируется в растении.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может повышать содержание специфической ненасыщенной жирной кислоты, содержащейся в растении.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может снижать содержание специфической ненасыщенной жирной кислоты, содержащейся в растении.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может влиять на прямой/опосредованный механизм для контроля содержания специфической ненасыщенной жирной кислоты, содержащейся в растении.

В одном иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может представлять собой, например, подвергнутый искусственной манипуляции ген FAD2, ген FAD3, ген FAD4, ген FAD6, ген FAD7 или ген FAD8, предпочтительно ген FAD2 или ген FAD3.

В одном иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может включать два или более подвергнутых искусственной манипуляции гена. Например, два или более гена, выбранных из группы, состоящей из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD4, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8, могут быть подвергнуты искусственной манипуляции.

Поэтому в иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению представлены один или более ассоциированных с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот факторов, подвергнутых искусственной манипуляции, выбранных из группы, состоящей из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD4, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8, которые подверглись модификации в последовательности нуклеиновой кислоты.

Модификация в последовательности нуклеиновой кислоты может быть без ограничения осуществлена путем искусственной манипуляции с помощью комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

Термин "комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок" относится к комплексу, образованному посредством взаимодействия между направляющей нуклеиновой кислотой и редактирующим белком, и при этом комплекс нуклеиновая кислота - белок включает направляющую нуклеиновую кислоту и редактирующий белок.

Комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может служить для модификации субъекта. Субъектом может быть целевая нуклеиновая кислота, ген, хромосома или белок.

Например, ген может представлять собой ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, искусственно манипулируемый комплексом направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок, где искусственно манипулируемый ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор включает одну или более модификаций нуклеиновой кислоты, которые представляют собой по меньшей мере одно из делеции или вставки одного или более нуклеотидов, замены одним или более нуклеотидами, отличными от нуклеотидов гена дикого типа, и вставки одного или более чужеродных нуклеотидов, в последовательности смежного с протоспейсером мотива (PAM) в пределах последовательности нуклеиновой кислоты, из которой состоит ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, или в пределах непрерывного участка последовательности оснований длиной от 1 п.о. до 50 п.о., смежного с ее 5'-концом и/или 3'-концом, или химическую модификацию одного или более нуклеотидов в последовательности нуклеиновой кислоты, из которой состоит составляющей ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор.

Модификация нуклеиновых кислот может осуществляться в промоторном участке гена.

Модификация нуклеиновых кислот может осуществляться в экзонном участке гена. В одном иллю-

стративном варианте осуществления 50% модификаций могут осуществляться на участке в 3'-5'-направлении по отношению к кодирующим участкам гена.

Модификация нуклеиновых кислот может осуществляться в интронном участке гена. Модификация нуклеиновых кислот может осуществляться в энхансерном участке гена.

Последовательность РАМ может представлять собой, например, одну или более из следующих последовательностей (описанных в 5'-3'-направлении):

NGG (N представляет собой A, T, C или G);

NNNNRYAC (каждый из N независимо представляет собой A, T, C или G, R представляет собой A или G, и Y представляет собой C или T);

NNAGAAW (каждый из N независимо представляет собой A, T, C или G, и W представляет собой A или T);

NNNNGATT (каждый из N независимо представляет собой A, T, C или G);

NNGRR(T) (каждый из N независимо представляет собой A, T, C или G, и R представляет собой A или G) и

TTN (N представляет собой A, T, C или G).

Редактирующий белок может быть получен из

Streptococcus pyogenes, Streptococcus thermophilus, Streptococcus sp., Staphylococcus aureus, Nocardiosis dassonvillei, Streptomyces pristinaespiralis, Streptomyces viridochromogenes, Streptomyces viridochromogenes, Streptosporangium roseum, Streptosporangium roseum, Alicyclobacillus acidocaldarius, Bacillus pseudomycooides, Bacillus selenitireducens, Exiguobacterium sibiricum, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus salivarius, Microscilla marina, Burkholderiales bacterium, Polaromonas naphthalenivorans, Polaromonas sp., Crocosphaera watsonii, Cyanothece sp., Microcystis aeruginosa, Synechococcus sp., Acetohalobium arabaticum, Ammonifex degensii, Caldicehulosiruptor besicii, Candidatus Desulforudis, Clostridium botulinum, Clostridium difficile, Finegoldia magna, Natranaerobius thermophilus, Pelotomaculum thermopropionicum, Acidithiobacillus caldus, Acidithiobacillus ferrooxidans, Allochromatium vinosum, Marinobacter sp., Nitrosococcus halophilus, Nitrosococcus watsonii, Pseudoalteromonas haloplanktis, Ktedonobacter racemifer, Methanohalobium evestigatum, Anabaena variabilis, Nodularia spumigena, Nostoc sp., Arthrospira maxima, Arthrospira platensis, Arthrospira sp., Lyngbya sp., Microcoleus chthonoplastes, Oscillatoria sp., Petrotoga mobilis, Thermosipho africanus или Acaryochloris marina.

В одном иллюстративном варианте осуществления редактирующий белок может представлять собой один или более, выбранных из группы, состоящей из белка Cas9, полученного из *Streptococcus pyogenes*, белка Cas9, полученного из *Campylobacter jejuni*, белка Cas9, полученного из *Streptococcus thermophilus*, белка Cas9, полученного из *Staphylococcus aureus*, белка Cas9, полученного из *Neisseria meningitidis*, и белка Cpf1. В качестве примера редактирующий белок может представлять собой белок Cas9, полученный из *Streptococcus pyogenes*, или белком Cas9, полученный из *Campylobacter jejuni*.

Кроме того, в другом варианте осуществления в настоящем изобретении представлена направляющая нуклеиновая кислота, которая способна образовывать комплементарную связь по отношению к целевым последовательностям под SEQ ID NO: 1-30, например, SEQ ID NO: 7 или 30.

Направляющая нуклеиновая кислота может образовывать комплементарную связь с частью последовательностей нуклеиновой кислоты гена FAD2. Она может создавать 0-5, 0-4, 0-3 или 0-2 ошибочных спаривания. В качестве предпочтительного примера направляющая нуклеиновая кислота может представлять собой нуклеотиды, образующие комплементарную связь с одной или несколькими из целевых последовательностей под SEQ ID NO: 1-30, например, SEQ ID NO: 7 или 30 соответственно.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать без ограничения нуклеотиды из 18-25 п.о., 18-24 п.о., 18-23 п.о., 19-23 п.о. или 20-23 п.о.

Кроме того, настоящее изобретение относится к композиции, предназначенной для геномной манипуляции, которая может быть использована в искусственной манипуляции с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором с определенной целью.

Композиция, предназначенная для геномной манипуляции, может включать комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок или кодирующую его последовательность нуклеиновой

кислоты.

Композиция, предназначенная для геномной манипуляции, может содержать:

(а) направляющую нуклеиновую кислоту, способную образовывать комплементарную связь по отношению к каждой из целевых последовательностей одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD4, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8 соответственно, или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую направляющую нуклеиновую кислоту;

(б) редактирующий белок, включающий один или более белков, выбранных из группы, состоящей из белка Cas9, полученного из *Streptococcus pyogenes*, белка Cas9, полученного из *Campylobacter jejuni*, белка Cas9, полученного из *Streptococcus thermophilus*, белка Cas9, полученного из *Staphylococcus aureus*, белка Cas9, полученного из *Neisseria meningitidis*, и белка Cpf1 соответственно, или кодирующую его последовательность нуклеиновой кислоты.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая нуклеиновая кислота может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая образует комплементарную связь по отношению к одной или более целевых последовательностей под SEQ ID NO: 1-30 соответственно.

Например, направляющая нуклеиновая кислота может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая образует комплементарную связь с целевой последовательностью под SEQ ID NO: 7 или 30.

В одном иллюстративном варианте осуществления композиция, предназначенная для геномной манипуляции, может представлять собой вирусную векторную систему.

Вирусный вектор может представлять собой векторную систему на основе *Agrobacterium* с использованием агробактерии.

В одном иллюстративном варианте осуществления композиция, предназначенная для геномной манипуляции, может представлять собой вирусную векторную систему.

Вирусный вектор может включать один или более вирусных векторов, выбранных из группы, состоящей из вируса мозаики, ретровируса, лентивируса, аденовируса, аденоассоциированного вируса (AAV), вируса осповакцины, поксвируса и вируса простого герпеса.

В одном иллюстративном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен способ искусственной манипуляции с клеткой, который предусматривает введение в клетки

(а) направляющей нуклеиновой кислоты, способной образовывать комплементарную связь по отношению к целевым последовательностям одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD4, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8 соответственно, или кодирующей его последовательности нуклеиновой кислоты; и

(б) редактирующего белка, включающего один или более белков, выбранных из группы, состоящей из белка Cas9, полученного из *Streptococcus pyogenes*, белка Cas9, полученного из *Campylobacter jejuni*, белка Cas9, полученного из *Streptococcus thermophilus*, белка Cas9, полученного из *Staphylococcus aureus*, белка Cas9, полученного из *Neisseria meningitidis*, и белка Cpf1 соответственно, или кодирующей его последовательности нуклеиновой кислоты.

Направляющая нуклеиновая кислота и редактирующий белок могут присутствовать в одном или более векторах в виде последовательности нуклеиновой кислоты или могут присутствовать в комплексе, образованном путем связывания направляющей нуклеиновой кислоты с редактирующим белком.

Введение может быть выполнено *in vivo* или *ex vivo* относительно растения.

Введение может быть выполнено с помощью одного или более способов, выбранных из бомбардировки геномной пушкой, электропорации, липосом, плазмид, векторной системы на основе *Agrobacterium*, вирусных векторов, наночастиц и способа слияния белка с доменом транслокации белка (PTD).

Вирусный вектор может включать один или более вирусных векторов, выбранных из группы, состоящей из вируса мозаики, ретровируса, лентивируса, аденовируса, аденоассоциированного вируса (AAV), вируса осповакцины, поксвируса и вируса простого герпеса.

Кроме того, в настоящем изобретении представлена композиция для контроля ненасыщенной жирной кислоты с целью контроля биосинтеза ненасыщенной жирной кислоты и/или содержания ненасыщенной жирной кислоты в растении.

Композиция для контроля ненасыщенной жирной кислоты может включать композицию для геномной манипуляции, которая может быть использована в искусственной манипуляции с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором.

Состав композиции для геномной манипуляции является таким же, как описано выше.

В иллюстративном варианте осуществления настоящее изобретение относится к переработанному продукту с использованием растительного организма с повышенным или сниженным содержанием специфической ненасыщенной жирной кислоты.

Растительный организм может содержать ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции.

Переработанный продукт может представлять собой пищевой продукт, который может поедаться людьми и/или животными.

В иллюстративном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен набор для ген-

ной манипуляции с целью контроля содержания специфической ненасыщенной жирной кислоты.

Набор может включать композицию для генной манипуляции, которая может быть использована в искусственной манипуляции с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором.

В отношении представляющего интерес гена можно осуществлять искусственную манипуляцию с использованием такого набора.

Положительные эффекты.

Растительный организм с повышенным содержанием специфической ненасыщенной жирной кислоты, которая полезна для здоровья человека, или со сниженным содержанием специфической ненасыщенной жирной кислоты, которая вредна для здоровья человека, и/или переработанный продукт с его применением могут быть получены с использованием ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, подвергнутого искусственной манипуляции, и системы для контроля ненасыщенной жирной кислоты, которая тем самым является искусственно модифицированной.

Например, может быть использован один или более генов, выбранных из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD4, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена схематическая диаграмма векторов CRISPR-Cas9, pPZP-FAD2-7 и pPZP-FAD2-30, предназначенных для модификации гена FAD2 сои.

На фиг. 2 показаны процессы роста организмов трансгенных растений сои, полученных путем нокаута гена FAD2 с использованием pPZP-FAD2-7(a) и pPZP-FAD2-30(b).

На фиг. 3 показаны T₀ трансформанты pPZP-FAD2-7 и pPZP-FAD2-30.

На фиг. 4 показаны результаты ПНР для подтверждения вставки генов в T₀ трансформантах pPZP-FAD2-7 и pPZP-FAD2-30. В данном случае NT представляет собой *Glucine max* L. Kwangan (дикого типа), а № 1, № 2, № 3, № 5, № 8, № 9, № 19 и № 21 представляют собой T₀ трансформанты.

На фиг. 5 показаны содержания олеиновой кислоты в T₁ семенах pPZP-FAD2-7 и pPZP-FAD2-30.

На фиг. 6 показана частота инсерционно-делеционной мутации гена FAD2, на который целенаправленно воздействуют с использованием CRISPR-Cas9.

На фиг. 7 показаны результаты секвенирования гена FAD2 сои, трансформированной с использованием CRISPR-Cas9 (целевой последовательности, включающей PAM, показанной подчеркиванием).

На фиг. 8 показаны результаты скрининга по целевому сайту и частоте инсерционно-делеционной мутации гена FAD2, подвергнутого манипуляции в T₁ трансформантах, показаны результаты скрининга по целевому сайту и частоте инсерционно-делеционной мутации гена FAD2 в (a) хромосоме № 10 (chr10) и (b) хромосоме № 20 (chr20).

На фиг. 9 показаны результаты секвенирования целевого сайта гена FAD2, подвергнутого манипуляции в T₁ трансформантах, показаны результаты секвенирования целевого сайта гена FAD2 в (a) хромосоме № 10 (chr10) и (b) хромосоме № 20 (chr20).

На фиг. 10 показаны T₁ трансформанты pPZP-FAD2-7 и pPZP-FAD2-30.

На фиг. 11 показаны результаты анализа удаления гена из T₁ трансформантов pPZP-FAD2-7 и pPZP-FAD2-30 с использованием ПНР.

Варианты осуществления изобретения

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют те же значения, как общеизвестные специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя могут быть использованы способы и материалы, подобные или аналогичные раскрываемым в описании, в реализации или экспериментах в настоящем изобретении ниже будут раскрыты подходящие способы и материалы. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылочные материалы, упомянутые в настоящем документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. Кроме того, материалы, способы и варианты осуществления являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Один аспект настоящего изобретения относится к трансгенному растительному организму с повышенным содержанием C8-24:D1 ненасыщенной жирной кислоты.

В частности, настоящее изобретение относится к трансгенному растительному организму с повышенным содержанием специфической ненасыщенной жирной кислоты, обеспечиваемым ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором, подвергнутым искусственной манипуляции, при этом настоящее изобретение включает ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, функция которого искусственно изменена, композицию, предназначенную для искусственной манипуляции с ним, способ его получения и растительный организм, содержащий его.

Другой аспект настоящего изобретения относится к трансгенному растительному организму со сниженным содержанием C8-24:D2 ненасыщенной жирной кислоты.

В частности, настоящее изобретение относится к трансгенному растительному организму со сниженным содержанием специфической ненасыщенной жирной кислоты, обеспечиваемым ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором, подвергнутым искусственной манипуляции, при этом настоящее изобретение включает ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных

кислот фактор, функция которого искусственно изменена, композицию, предназначенную для искусственной манипуляции с ним, способ его получения и растительный организм, содержащий его.

Ненасыщенная жирная кислота.

Один аспект настоящего изобретения относится к системе, предназначенной для изменения содержания жирных кислот.

В одном примере может быть представлена система, предназначенная для изменения содержания специфической насыщенной жирной кислоты в растительном организме.

В другом примере может быть представлена система, предназначенная для изменения содержания специфической ненасыщенной жирной кислоты в растительном организме.

Термин "жирная кислота", используемый в настоящем документе, относится к карбоновой кислоте, имеющей алифатическую цепь, при этом большинство жирных кислот, продуцируемых в естественном состоянии, имеют четное количество атомов углерода, варьирующее от приблизительно 4 до 36 и образующих углеродную цепь. Жирные кислоты в основном подразделяют на насыщенные жирные кислоты и ненасыщенные жирные кислоты по типу углеродной связи.

Термин "насыщенная жирная кислота", используемый в настоящем документе, относится к жирным кислотам, образованным с одинарной связью.

Жирные кислоты включают пропионовую кислоту, масляную кислоту, валерьяновую кислоту, капроновую кислоту, энантовую кислоту, каприловую кислоту, пеларгоновую кислоту, каприновую кислоту, лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, арахидоновую кислоту, бегеновую кислоту, лигноцериновую кислоту, церотиновую кислоту и т.п.

Термин "ненасыщенные жирные кислоты", используемый в настоящем документе, относится к жирным кислотам с одной или более углерод-углерод двойными связями. Ненасыщенные жирные кислоты включают все цис-ненасыщенные жирные кислоты и транс-ненасыщенные жирные кислоты. Цис-ненасыщенные жирные кислоты относятся к ненасыщенным жирным кислотам, в которых два атома водорода, соответственно связывающиеся с двумя атомами углерода, участвующими в двойной связи, структурно расположены в одном направлении. С другой стороны, транс-ненасыщенные жирные кислоты относятся к ненасыщенным жирным кислотам, в которых два атома водорода, соответственно связывающиеся с двумя атомами углерода, участвующими в двойной связи, структурно расположены в разных направлениях.

Ненасыщенные жирные кислоты могут быть классифицированы на омега-3, 6, 7 и 9 согласно положению углерода, участвующего в двойной связи.

Ненасыщенные жирные кислоты включают омега-3 (ω -3) жирные кислоты.

В данном случае термин "омега-3 (ω -3) жирные кислоты" относится к ненасыщенной жирной кислоте, в которой двойная связь начинается от третьего углерода на конце углеродной цепи, и включает альфа-линоленовую кислоту (ALA), эйкозапентаеновую кислоту (EPA) и докозагексаеновую кислоту (DHA).

Ненасыщенные жирные кислоты включают омега-6 (ω -6) жирные кислоты.

В данном случае термин "омега-6 (ω -6) жирные кислоты" относится к ненасыщенным жирным кислотам, в которых двойная связь начинается от шестого углерода на конце углеродной цепи, и включает в себя линолевую кислоту (LA), гамма-линоленовую кислоту (GLA), дигомо-гамма-линоленовую кислоту (DGLA) и арахидоновую кислоту (AA).

Ненасыщенные жирные кислоты включают омега-7 (ω -7) жирные кислоты.

В данном случае термин "омега-7 (ω -7) жирные кислоты" относится к ненасыщенным жирным кислотам, в которых двойная связь начинается от седьмого углерода на конце углеродной цепи, и включает паулиновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту или вакценовую кислоту.

Ненасыщенные жирные кислоты включают омега-9 (ω -9) жирные кислоты.

В данном случае термин "омега-9 (ω -9) жирные кислоты" относится к ненасыщенным жирным кислотам, в которых двойная связь начинается от девятого углерода на конце углеродной цепи, и включает олеиновую кислоту, элаидиновую кислоту, эйкозеновую кислоту, эруковую кислоту и нервоновую кислоту.

В одном иллюстративном варианте осуществления ненасыщенная жирная кислота может представлять собой омега-6 (ω -6) жирную кислоту.

В другом иллюстративном варианте осуществления ненасыщенная жирная кислота может представлять собой омега-9 (ω -9) жирную кислоту.

Кроме того, ненасыщенная жирная кислота может быть классифицирована как CN:DN ненасыщенная жирная кислота по указанию количества атомов углерода и количества двойных связей.

Термин "CN:DM ненасыщенная жирная кислота" относится к ненасыщенной жирной кислоте, состоящей из количества N атомов углерода (C) и включающей количество M двойных связей (D). В данном случае N может представлять собой целое число от 4 до 36, а M может представлять собой целое число от 1 до 35.

Например, ненасыщенная жирная кислота, состоящая из 18 атомов углерода и включающая 2 двой-

Предпочтительно ненасыщенная жирная кислота может быть выбрана из группы, состоящей из C16:D2 ненасыщенной жирной кислоты, C18:D2 ненасыщенной жирной кислоты, C20:D2 ненасыщенной жирной кислоты и C22:D2 ненасыщенной жирной кислоты.

Наиболее предпочтительно ненасыщенная жирная кислота может представлять собой C18:D2 ненасыщенную жирную кислоту или C20:D2 ненасыщенную жирную кислоту.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор.

Другой аспект настоящего изобретения относится к ассоциированному с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактору, подвергнутому искусственной манипуляции или модификации.

Термин "ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор", используемый в настоящем документе, относится ко всем фактора, непосредственно участвующим в биосинтезе ненасыщенной жирной кислоты или опосредованно влияющим на него. В данном случае фактор может представлять собой ДНК, РНК, ген, пептид, полипептид или белок.

В иллюстративном варианте осуществления ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор включает различные материалы, способные контролировать биосинтез ненасыщенной жирной кислоты, которые являются природными, то есть, подвергнутыми искусственной манипуляции. Например, ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может представлять собой подвергнутый генетической манипуляции или модификации ген или белок, который экспрессируется в растении.

Термин "искусственно манипулируемый" означает искусственно модифицированное состояние, то есть состояние, которое не существует в природе.

Термин "подвергаемый/подвергнутый генетической манипуляции" означает, что генетическая модификация искусственно осуществляется в материалах растительного происхождения, которые упоминаются в настоящем изобретении и которые могут представлять собой, например, гены и генные продукты (полипептиды, белки и т.д.), геномы которых искусственно модифицированы с определенной целью.

В качестве предпочтительного примера в настоящем изобретении представлен ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, который подвергают генетической манипуляции или модифицируют с определенной целью.

Гены или белки, обладающие перечисленными ниже функциями, могут иметь множество типов функций, а не только один тип функции, связанной с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот. Кроме того, при необходимости могут быть представлены две или более функции и два или более фактора, ассоциированных с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может инициировать продуцирование ненасыщенной жирной кислоты за счет образования одной или более двойных связей в ненасыщенной жирной кислоте.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может инициировать образование новой одной или более двойных связей в ненасыщенной жирной кислоте.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может изменять положение одной или более двойных связей, включенных в ненасыщенную жирную кислоту.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может инициировать удаление одной или более двойных связей ненасыщенной жирной кислоты с двумя или более двойными связями.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может инициировать превращение цис-ненасыщенной жирной кислоты в транс-ненасыщенную жирную кислоту.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может инициировать превращение транс-ненасыщенной жирной кислоты в цис-ненасыщенную жирную кислоту.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может контролировать содержание ненасыщенной жирной кислоты, содержащейся в растении.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может повышать содержание специфической ненасыщенной жирной кислоты, содержащейся в растении.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может снижать содержание специфической ненасыщенной жирной кислоты, содержащейся в растении.

В иллюстративном варианте осуществления ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может быть связан с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором растения.

Предпочтительно ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может представлять собой ген FAD или белок FAD.

Наиболее предпочтительно ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может представлять собой одно или более выбранное из группы, состоящей из FAD2, FAD3, FAD6, FAD7 и FAD8.

В любом иллюстративном варианте осуществления ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может представлять собой FAD2.

Ген FAD2 (десатуразы омега-6 жирных кислот) относится к гену (полноразмерной ДНК, кДНК или

мРНК), кодирующему белок FAD2, также известный под названием FAD2-1, FAD2-1B или GMFAD2-1B. В одном примере ген FAD2 может представлять собой один или более генов, выбранных из группы, состоящей из следующих генов, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими: гены, кодирующие растительный, например, соевый (*Glycine max*) FAD2 (например, под номерами доступа в NCBI NP_001341865.1, XP_006605883.1, XP_006605882.1, XP_006605885.1, XP_006605884.1 или XP_014627765.1), например, гены FAD2, представленные под номерами доступа в NCBI NM_001354936.1, XM_006605820.2, XM_006605819.2, XM_006605822.2, XM_006605821.2 или XM_014772279.1.

В любом иллюстративном варианте осуществления ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может представлять собой FAD3.

Ген FAD3 (микросомальной десатуразы омега-3 жирных кислот) относится к гену (полноразмерной ДНК, кДНК или мРНК), кодирующему белок FAD3, также известному под названием Fanx. В одном примере ген FAD3 может представлять собой один или более генов, выбранных из группы, состоящей из следующих генов, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими: ген, кодирующий растительный, например, соевый (*Glycine max*) FAD3 (например, под номером доступа в NCBI NP_001237507.1), например, ген FAD3, представленный под номером доступа в NCBI NM_001250578.1.

В любом иллюстративном варианте осуществления ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может представлять собой FAD6.

Ген FAD6 (десатуразы жирных кислот 6) относится к гену (полноразмерной ДНК, к ДНК или мРНК), кодирующему белок FAD6, также известному под названием FADC или SFD4. В одном примере ген FAD6 может представлять собой один или более генов, выбранных из группы, состоящей из следующих генов, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими: ген, кодирующий растительный, например, FAD6 *Arabidopsis thaliana* (например, под номером доступа в NCBI NP_194824.1), например, ген FAD6, представленный под номером доступа в NCBI NM_119243.4.

В любом иллюстративном варианте осуществления ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может представлять собой FAD7.

Ген FAD7 (изоформы 2 хлоропластовой десатуразы омега-3 жирных кислот) относится к гену (полноразмерной ДНК, кДНК или мРНК), кодирующему белок FAD7. В одном примере ген FAD7 может представлять собой один или более генов, выбранных из группы, состоящей из следующих генов, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими: ген, кодирующий растительный, например, соевый (*Glycine max*) FAD7 (например, под номером доступа в NCBI NP_001237361.1), например, ген FAD7, представленный под номером доступа в NCBI NM_001250432.1.

В любом иллюстративном варианте осуществления ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может представлять собой FAD8.

Ген FAD8 (подобной хлоропластовой десатуразы омега-3 жирных кислот) относится к гену (полноразмерной ДНК, кДНК или мРНК), кодирующему белок FAD8. В одном примере ген FAD8 может представлять собой один или более генов, выбранных из группы, состоящей из следующих генов, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими: ген, кодирующий растительный, например, соевый (*Glycine max*) FAD8 (например, под номером доступа в NCBI NP_001239777.1), например, ген FAD8, представленный под номером доступа в NCBI NM_001252848.1.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор может быть получен из растения, такого как соя, *Arabidopsis thaliana*, кунжут, кукуруза и т.п. и т.д.

Информацию о генах можно получить из известной базы данных, такой как GeneBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI).

В одном иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, например, FAD2, FAD3, FAD6, FAD7 или FAD8, может представлять собой ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции.

В определенном варианте осуществления ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергаемый искусственной манипуляции, может быть подвергнут генетической манипуляции.

Генная манипуляция или модификация может быть осуществлена с помощью искусственной вставки, делеции, замены или инверсии, осуществляемых в части или во всем участке геномной последовательности гена дикого типа. Кроме того, генная манипуляция или модификация может быть достигнута за счет слияния манипуляции с двумя или более генами или их модификации.

Например, ген может быть дополнительно активирован такой за счет такой генной манипуляцией или модификации, поэтому белок, кодируемый геном, подлежащим экспрессии в форме белка, обладает улучшенной функцией по сравнению с природной функцией. В качестве примера, если функция белка, кодируемого определенным геном, представляет собой А, то функция белка, экспрессируемого подвергнутым манипуляции геном, может совершенно отличаться от А или может включать дополнительную функцию (А+В), в том числе А. Например, слитые два или более белков могут быть экспрессированы с использованием двух или более генов, обладающих различными или комплементарными функциями

благодаря такой генной манипуляции или модификации.

Например, два или более белка могут быть экспрессированы отдельно или независимо в клетках с использованием двух или более генов, обладающих различными или комплементарными функциями благодаря такой генной манипуляции или модификации.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый манипуляции, может продуцировать ненасыщенную жирную кислоту за счет образования одной или более двойных связей в насыщенной жирной кислоте.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый манипуляции, может инициировать образование новой одной или более двойных связей в ненасыщенной жирной кислоте.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый манипуляции, может изменять положения одной или более двойных связей, включенных в ненасыщенную жирную кислоту.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый манипуляции, может инициировать удаление одной или более двойных связей в ненасыщенной жирной кислоте, имеющей две или более двойных связей.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый манипуляции, может инициировать превращение цис-ненасыщенной жирной кислоты в транс-ненасыщенную жирную кислоту.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый манипуляции, может инициировать превращение транс-ненасыщенной жирной кислоты в цис-ненасыщенную жирную кислоту.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый манипуляции, может контролировать содержание ненасыщенной жирной кислоты, содержащейся в растении.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый манипуляции, может повышать содержание специфической ненасыщенной жирной кислоты, содержащейся в растении.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый манипуляции, может снижать содержание специфической ненасыщенной жирной кислоты, содержащейся в растении.

Манипуляция включает все типы структурных или функциональных модификаций ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора.

Структурная модификация ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора включает все типы модификаций, которые не являются такими же, как модификации дикого типа, существующие в природном состоянии.

Например, если ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор представляет собой ДНК, РНК или ген, то структурная модификация может представлять собой потерю одного или более нуклеотидов.

Структурная модификация может представлять собой вставку одного или более нуклеотидов.

В данном случае вставленные нуклеотиды включают все от субъекта, содержащего ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, и нуклеотиды, поступающие в субъекта извне.

Структурная модификация может представлять собой замену одного или более нуклеотидов.

Структурная модификация может представлять собой химическую модификацию одного или более нуклеотидов.

В данном случае химическая модификация включает все из добавления, удаления и замены химических функциональных групп.

В качестве другого примера, если ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор представляет собой пептид, полипептид или белок, то структурная модификация может представлять собой потерю одной или более аминокислот.

Структурная модификация может представлять собой вставку одной или более аминокислот.

В данном случае аминокислоты включают все от субъекта, содержащего ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, и аминокислоты, поступающие в субъекта извне.

Структурная модификация может представлять собой замену одной или более аминокислот.

Структурная модификация может представлять собой химическую модификацию одной или более аминокислот.

В данном случае химическая модификация включает все из добавления, удаления и замены химических функциональных групп.

Структурная модификация может представлять собой частичное или полное присоединение другого пептида, полипептида или белка.

В данном случае другой пептид, полипептид или белок может представлять собой ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор или пептид, полипептид или белок, обладаю-

ший другой функцией.

Функциональная модификация ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора может включать все типы, обладающие улучшенной или сниженной функцией по сравнению с такими у дикого типа, существующими в естественном состоянии, и обладающие третьей отличной функцией.

Например, если ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор представляет собой пептид, полипептид или белок, то функциональная модификация может представлять собой мутацию в ассоциированном в биосинтезе ненасыщенных жирных кислот факторе.

В данном случае мутация может представлять собой мутацию, которая усиливает или подавляет функцию ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора.

Функциональная модификация может предусматривать дополнительную функцию ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора.

В данном случае дополнительная функция может быть такой же или другой функцией. Кроме того, ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, обладающий дополнительной функцией, может быть слит с другим пептидом, полипептидом или белком.

Функциональная модификация может представлять собой усиление функциональности за счет повышенной экспрессии ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора.

Функциональная модификация может представлять собой снижение функциональности за счет сниженной экспрессии ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора.

В иллюстративном варианте осуществления ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый манипуляции, может быть индуцирован с помощью одной или более следующих мутаций:

полные или частичные делеции ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, то есть гена, подлежащего манипуляции (далее называемого целевым геном), например, делеция 1 п.о. или больше нуклеотидов, например, 1-30, 1-27, 1-25, 1-23, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-3 или 1 нуклеотида в целевом гене,

замена 1 п.о. или больше нуклеотидов, например, 1-30, 1-27, 1-25, 1-23, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-3 или 1 нуклеотида в целевом гене, нуклеотидом, отличным от дикого типа, и

вставка одного или больше нуклеотидов, например, 1-30, 1-27, 1-25, 1-23, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-3 или 1 нуклеотида (при этом каждый независимо выбран из А, Т, С и G), в определенном местоположении в целевом гене.

Часть модифицированного целевого гена ("целевого участка") может быть непрерывной из 1 п.о. или больше, 3 п.о. или больше, 5 п.о. или больше, 7 п.о. или больше, 10 п.о. или больше, 12 п.о. или больше, 15 п.о. или больше, 17 п.о. или больше, или 20 п.о. или больше, например, 1 п.о. - 30 п.о., 3 п.о. - 30 п.о., 5 п.о. - 30 п.о., 7 п.о. - 30 п.о., 10 п.о. - 30 п.о., 12 п.о. - 30 п.о., 15 п.о. - 30 п.о., 17 п.о. - 30 п.о., 20 п.о. - 30 п.о., 1 п.о. - 27 п.о., 3 п.о. - 27 п.о., 5 п.о. - 27 п.о., 7 п.о. - 27 п.о., 10 п.о. - 27 п.о., 12 п.о. - 27 п.о., 15 п.о. - 27 п.о., 17 п.о. - 27 п.о., 20 п.о. - 27 п.о., 1 п.о. - 25 п.о., 3 п.о. - 25 п.о., 5 п.о. - 25 п.о., 7 п.о. - 25 п.о., 10 п.о. - 25 п.о., 12 п.о. - 25 п.о., 15 п.о. - 25 п.о., 17 п.о. - 25 п.о., 20 п.о. - 25 п.о., 1 п.о. - 23 п.о., 3 п.о. - 23 п.о., 5 п.о. - 23 п.о., 7 п.о. - 23 п.о., 10 п.о. - 23 п.о., 12 п.о. - 23 п.о., 15 п.о. - 23 п.о., 17 п.о. - 23 п.о., 20 п.о. - 23 п.о., 1 п.о. - 20 п.о., 3 п.о. - 20 п.о., 5 п.о. - 20 п.о., 7 п.о. - 20 п.о., 10 п.о. - 20 п.о., 12 п.о. - 20 п.о., 15 п.о. - 20 п.о., 17 п.о. - 20 п.о., 21 п.о. - 25 п.о., 18 п.о. - 22 п.о., или 21 п.о. - 23 п.о., участка основной последовательности гена.

Система, предназначенная для контроля ненасыщенных жирных кислот.

Один аспект настоящего изобретения относится к системе, предназначенной для контроля ненасыщенной жирной кислоты, которая контролирует биосинтез ненасыщенной жирной кислоты за счет искусственной манипуляции с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором.

Термин "система, предназначенная для контроля ненасыщенной жирной кислоты", используемый в настоящем документе, включает все явления, оказывающие влияние на стимулирование или ингибирование биосинтеза ненасыщенной жирной кислоты и/или на повышение или ингибирование продуцирования ненасыщенных жирных кислот путем изменения функций ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, подвергнутого искусственной манипуляции, а также включает материалы, композиции, способы и применения, непосредственно или опосредованно вовлеченные в систему контроля биосинтеза ненасыщенной жирной кислоты.

Каждый фактор, из которого состоит система, предназначенная для обеспечения контроля биосинтеза ненасыщенной жирной кислоты, также называется "фактором контроля ненасыщенной жирной кислоты".

Система в соответствии с настоящим изобретением содержит модифицированный механизм в растительном организме, который связан с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором, подвергнутому искусственной манипуляции. С помощью ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, подвергнутого искусственной манипуляции, в любом иллюстративном варианте осуществления можно контролировать биосинтез C8-24:D1 ненасыщенной жирной кислоты,

в любом иллюстративном варианте осуществления можно контролировать биосинтез C8-24:D2 ненасыщенной жирной кислоты,

в любом иллюстративном варианте осуществления можно контролировать продуцируемое количество C8-24:D1 ненасыщенной жирной кислоты,

в любом иллюстративном варианте осуществления можно контролировать продуцируемое количество C8-24:D2 ненасыщенной жирной кислоты,

в любом иллюстративном варианте осуществления можно контролировать содержание C8-24:D1 ненасыщенной жирной кислоты в растительном организме,

в любом иллюстративном варианте осуществления можно контролировать содержание C8-24:D2 ненасыщенной жирной кислоты в растительном организме,

в любом иллюстративном варианте осуществления можно контролировать соотношение содержания C8-24:D1 ненасыщенной жирной кислоты и C8-24:D2 ненасыщенной жирной кислоты в растительном организме,

в любом иллюстративном варианте осуществления можно добавлять или удалять двойную связь в C8-24:D1 ненасыщенной жирной кислоте, и

в любом иллюстративном варианте осуществления можно добавлять или удалять двойную связь в C8-24:D2 ненасыщенной жирной кислоте.

В другом иллюстративном варианте осуществления система, предназначенная для контроля ненасыщенной жирной кислоты, в соответствии с настоящим изобретением включает композицию для манипуляции с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором.

Композиция для манипуляции может представлять собой композицию, способную осуществлять искусственную манипуляцию с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором, и предпочтительно композицию, предназначенную для генной манипуляции.

Далее будет описана композиция, предназначенная для генной манипуляции.

Композиция, предназначенная для манипуляции с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором.

Манипуляция с веществами или модификация веществ, вовлеченных в ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор и система, предназначенная для контроля ненасыщенной жирной кислоты, в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно осуществляется за счет генетической манипуляции.

В одном аспекте могут быть представлены композиция и способ манипуляции геном путем нацеливания на частичный или полный некодирующий или кодирующий участок ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора.

В иллюстративном варианте осуществления композиция и способ могут быть использованы в манипуляции или модификации одного или более ассоциированных с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот генов, вовлеченных в образование требуемой системы, предназначенной для контроля ненасыщенной жирной кислоты. Манипуляция или модификация может быть выполнена путем модификации нуклеиновых кислот, из которых состоит ген. В результате манипуляции включены все из нокадаун, нокаута и нокина.

В иллюстративном варианте осуществления манипуляция может быть выполнена путем нацеливания на промоторный участок или последовательность транскрипции, например, интронную или экзонную последовательность. Кодирующая последовательность, например, кодирующий участок, исходный кодирующий участок, могут быть целью для модификации экспрессией и нокаутом.

В иллюстративном варианте осуществления модификация нуклеиновых кислот может представлять собой замену, делецию и/или вставку одного или более нуклеотидов, например, 1-30 п.о., 1-27 п.о., 1-25 п.о., 1-23 п.о., 1-20 п.о., 1-15 п.о., 1-10 п.о., 1-5 п.о., 1-3 п.о. или 1 п.о. нуклеотида.

В иллюстративном варианте осуществления для нокаута одного или более ассоциированных с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот генов, устранения экспрессии одного или более генов или одного или более нокаутов одного или двух аллелей можно нацеливаться на вышеупомянутый участок, так что один или более ассоциированных с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот генов будут содержать делецию или мутацию.

В иллюстративном варианте осуществления нокаун гена может быть использован для снижения экспрессии нежелательных аллелей или транскриптомов.

В иллюстративном варианте осуществления можно нацеливаться на некодирующие последовательности промотора, энхансера, интрона, 3'UTR и/или сигнала полиаденилирования, подлежащие использованию в модификации ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот гена, влияющего на функцию биосинтеза ненасыщенной жирной кислоты.

В иллюстративном варианте осуществления активность ассоциированного с биосинтезом ненасыщенной жирной кислоты гена можно регулировать, например, активировать или инактивировать путем модификации нуклеиновой кислоты гена.

В иллюстративном варианте осуществления модификация нуклеиновой кислоты гена может инициировать каталитическое расщепление одинарной нити или двойных нитей, то есть разрушать нити

нуклеиновой кислоты в определенном участке целевого гена с помощью комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок, что приводит к инактивации целевого гена.

В иллюстративном варианте осуществления разрывы в нити нуклеиновой кислоты могут быть репарированы посредством механизма, такого как гомологичная рекомбинация или негомологичное соединение концов (NHEJ).

В этом случае, если имеет место механизм NHEJ, то индуцируется изменение в последовательности ДНК по сайту расщепления, что приводит к инактивации гена. Репарация с помощью NHEJ может индуцировать замену, вставку или делецию короткого фрагмента геномного и может быть использована в индуцировании нокаута соответствующего гена.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, предназначенной для манипуляции с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором.

Композиция, предназначенная для манипуляции, представляет собой композицию, которая способна осуществлять искусственную манипуляцию с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором, и предпочтительно композицию, предназначенную для геномной манипуляции.

Композиция может быть использована в геномной манипуляции для одного или более ассоциированных с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот факторов, вовлеченных в образование требуемой системы, предназначенной для контроля ненасыщенной жирной кислоты.

Геномная манипуляция может быть выполнена с учетом процесса регуляции экспрессии генов.

В иллюстративном варианте осуществления ее можно выполнять путем выбора подходящих средств для манипуляции каждой стадии транскрипции, процессинга РНК, транспорта РНК, расщепления РНК, трансляции и стадий регуляции модификации белка.

В иллюстративном варианте осуществления малая РНК (sRNA) взаимодействует с мРНК или снижает ее стабильность с использованием РНК-интерференции (RNAi) или РНК-сайленсинга, а в некоторых случаях расщепляет мРНК с прерыванием доставки информации о синтезе белка, что приводит к регуляции экспрессии генетической информации.

Манипуляция с геном может быть выполнена путем модификации нуклеиновых кислот, из которых состоит ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор. В результате манипуляции включены все из нокадауна, нокаута и нокина.

В определенном варианте осуществления модификация нуклеиновых кислот может представлять собой замену, делецию и/или вставку одного или более нуклеотидов, например, 1-30 п.о., 1-27 п.о., 1-25 п.о., 1-23 п.о., 1-20 п.о., 1-15 п.о., 1-10 п.о., 1-5 п.о., 1-3 п.о. или 1 п.о. нуклеотида.

В определенном варианте осуществления для нокаута одного или более ассоциированных с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот факторов, для устранения экспрессии одного или более факторов или для одного или более нокаутов одного или двух аллелей манипуляцию с геном можно осуществлять так, что один или более ассоциированных с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот факторов будут содержать делецию или мутацию.

В определенном варианте осуществления нокаун ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора может быть использован для снижения экспрессии нежелательных аллелей или транскриптомов.

В определенном варианте осуществления модификация нуклеиновых кислот может представлять собой вставку одного или более фрагментов нуклеиновой кислоты или генов. В данном случае фрагментом нуклеиновой кислоты может быть последовательность нуклеиновой кислоты, состоящая из одного или более нуклеотидов, и длина фрагмента нуклеиновой кислоты может составлять 1-40 п.о., 1-50 п.о., 1-60 п.о., 1-70 п.о., 1-80 п.о., 1-90 п.о., 1-100 п.о., 1-500 п.о. или 1-1000 п.о.. В данном случае вставленным геном может быть один из ассоциированных с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот факторов или гена, обладающего иной функцией.

В иллюстративном варианте осуществления в ходе модификации нуклеиновых кислот можно использовать фермент дикого типа или вариант фермента, который способен каталитически гидролизовать (расщеплять) связи между нуклеиновыми кислотами в молекуле ДНК или РНК, предпочтительно в молекуле ДНК. Также можно использовать комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

Например, ген можно подвергать манипуляцию с использованием одной или более нуклеаз, выбранных из группы, состоящей из мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами, CRISPR/Cas9 (белка Cas9), CRISPR-Cpf1 (белка Cpf1) и TALE-нуклеазы, за счет чего осуществляется регуляция экспрессии генетической информации.

В определенном варианте осуществления без ограничения геномная манипуляция может быть опосредована NHEJ или направляемой гомологией репарацией (HDR) с использованием комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок, например, системы CRISPR/Cas.

В случае механизма NHEJ может быть индуцировано изменение в последовательности ДНК по сайту расщепления с инактивацией тем самым гена. Репарация с помощью NHEJ может индуцировать замену, вставку или делецию короткого фрагмента гена и может быть использована в индуцировании нокаута соответствующего гена.

В другом аспекте в настоящем изобретении может быть представлен сайт генной манипуляции.

В иллюстративном варианте осуществления, если ген модифицирован за счет опосредованной NHEJ модификацией, сайтом для генной манипуляции может быть сайт в гене, инициирующий снижение или устранение экспрессии ассоциированного с биосинтезом ненасыщенной жирной кислоты генного продукта.

Например, сайт может располагаться в исходном кодирующем участке, промоторной последовательности, энхансерной последовательности, специфической интронной последовательности или специфической экзонной последовательности.

В иллюстративном варианте осуществления композиция, предназначенная для манипуляции с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором, может нацеливаться на ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, влияющий на регуляцию биосинтеза ненасыщенной жирной кислоты, такой как ген FAD, предпочтительно ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 или ген FAD8, служащий в качестве субъекта манипуляции. Наиболее предпочтительно композиция, предназначенная для манипуляции с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором, может нацеливаться на ген FAD2, служащий в качестве субъекта манипуляции.

Примеры целевых участков гена FAD2, то есть целевых последовательностей для участков, в которых осуществляется генная манипуляция или которые распознаются для генной манипуляции, кратко описаны в табл. 1.

Целевая последовательность может нацеливаться на один или более генов.

Целевая последовательность может одновременно нацеливаться на два или более генов. В данном случае двумя или более генами могут быть гомологичные гены или гетерологичные гены.

Ген может содержать одну или более целевых последовательностей.

На ген можно одновременно нацеливаться по двум или более целевым последовательностям.

Ген может быть изменен по сайту и по количеству генных манипуляций согласно количеству целевых последовательностей.

Генная манипуляция может быть разработана в различных формах в зависимости от количества и положений целевых последовательностей.

Генная манипуляция может одновременно происходить в двух или более целевых последовательностях. В данном случае две или более целевых последовательности могут присутствовать в гомологичном гене или гетерологичном гене.

Генная манипуляция может осуществляться одновременно в отношении двух или более генов. В данном случае двумя или более генами могут быть гомологичные гены или гетерологичные гены.

Далее в следующих таблицах показаны примеры целевых последовательностей, которые могут использоваться в вариантах осуществления по настоящему изобретению.

Таблица 1

Целевые последовательности гена FAD2

№	Целевая последовательность (включая PAM)
1	ATAGATTGGCCATGCAATGAGGG (SEQ ID NO: 1)
2	AATAGATTGGCCATGCAATGAGG (SEQ ID NO: 2)
3	CCTTGGAGAACCCAATAGATTGG (SEQ ID NO: 3)
4	TGGGTGATTGCTCACGAGTGTGG (SEQ ID NO: 4)
5	TTTTAGTCCCTTATTCTCATGG (SEQ ID NO: 5)
6	AAACACTTCATCACGGTCAAGGG (SEQ ID NO: 6)
7	GTGTTTGGAAACCTTGAGAGAGG (SEQ ID NO: 7)
8	GTGAATGGTGGCTTTGTGTTTGG (SEQ ID NO: 8)
9	ACAAAGCCACCATTCACTGTTGG (SEQ ID NO: 9)
10	AGTTGGCCAACAGTGAATGGTGG (SEQ ID NO: 10)
11	TTGAGTTGGCCAACAGTGAATGG (SEQ ID NO: 11)
12	TGAAAGGTCATAAACACATAGG (SEQ ID NO: 12)
13	CAAACACTTCATCACGGTCAAGG (SEQ ID NO: 13)
14	AACCAAAATCCAAAGTTGCATGG (SEQ ID NO: 14)
15	TGGGAGCATAAGGGTGGTAGTGG (SEQ ID NO: 15)
16	AATATATGGGAGCATAAGGGTGG (SEQ ID NO: 16)
17	GTTTGGCTGCTATGTGTTTATGG (SEQ ID NO: 17)
18	TTTGGCTGCTATGTGTTTATGGG (SEQ ID NO: 18)
19	TTGGCTGCTATGTGTTTATGGGG (SEQ ID NO: 19)
20	GCAACTATGGACAGAGATTATGG (SEQ ID NO: 20)
21	SACCATTTTACAAGGCACTGTGG (SEQ ID NO: 21)
22	CTTCATCTGGCTCCACATAGAGG (SEQ ID NO: 22)
23	CTCTATGTGGAGCCAGATGAAGG (SEQ ID NO: 23)
24	TTCTCGGATGTTTCCTTCATCTGG (SEQ ID NO: 24)
25	AGATGAAGGAACATCCGAGAAGG (SEQ ID NO: 25)

26	GATGAAGGAACATCCGAGAAGGG (SEQ ID NO: 26)
27	CATCCGAGAAGGGCGTGTATTGG (SEQ ID NO: 27)
28	GTACCAATACACGCCCTTCTCGG (SEQ ID NO: 28)
29	AGAAGGGCGTGTATTGGTACAGG (SEQ ID NO: 29)
30	TTGGGACAAACACTTCATCACGG (SEQ ID NO: 30)

Композиция для манипуляции - система "генные ножницы".

Система, предназначенная для контроля ненасыщенной жирной кислоты в соответствии с настоящим изобретением, может включать комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок в качестве композиции, предназначенной для манипуляции с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором.

Комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

Термин "комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок" относится к комплексу, образованному за счет взаимодействия между направляющей нуклеиновой кислотой и редактирующим белком, а комплекс нуклеиновая кислота - белок включает направляющую нуклеиновую кислоту и редактирующий белок.

Термин "направляющая нуклеиновая кислота" относится к нуклеиновой кислоте, способной распознавать целевые нуклеиновую кислоту, ген, хромосому или белок.

Направляющая нуклеиновая кислота может присутствовать в форме ДНК, РНК или гибрида ДНК/РНК и может иметь последовательность нуклеиновой кислоты из 5-150 оснований.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать один или более доменов.

Домены могут представлять собой без ограничения направляющий домен, первый комплементарный домен, линкерный домен, второй комплементарный домен, проксимальный домен или хвостовой домен.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать два или более доменов, которые могут быть повторами одинаковых доменов или могут быть разными доменами.

Направляющая нуклеиновая кислота может иметь одну непрерывную последовательность нуклеиновой кислоты.

Например, одной непрерывной последовательностью нуклеиновой кислоты может быть $(N)_m$, где N представляет собой A, T, C или G, или A, U, C или G, и m представляет собой целое число от 1 до 150.

Направляющая нуклеиновая кислота может иметь две или более непрерывных последовательности нуклеиновой кислоты.

Например, две или более непрерывных последовательности нуклеиновой кислоты могут представлять собой $(N)_m$ и $(N)_o$, где N представляет собой A, T, C или G, или A, U, C или G, m и o представляют собой целое число от 1 до 150, и m и o могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга.

Термин "редактирующий белок" относится к пептиду, полипептиду или белку которой может непосредственно связываться или взаимодействовать с нуклеиновой кислотой без непосредственного связывания с ней.

Редактирующий белок может представлять собой фермент. Редактирующий белок может представлять собой слитый белок.

В данном случае термин "слитый белок" относится к белку, который получен путем слияния фермента с дополнительным доменом, пептидом, полипептидом или белком.

Термин "фермент" относится к белку, который содержит домен, способный расщеплять нуклеиновую кислоту, ген, хромосому или белок.

Дополнительные домен, пептид, полипептид или белок могут представлять собой функциональный домен, пептид, полипептид или белок, которые обладают функцией такой же или отличной от такой у фермента.

Слитый белок может включать дополнительные домен, пептид, полипептид или белок в одном или более участках amino-конца (N-конца) фермента или рядом с ним; карбокси-конца (C-конца) или рядом с ним; средней части фермента и их комбинации.

Слитый белок может включать функциональные домен, пептид, полипептид или белок в одном или более участках N-конца фермента или рядом с ним; C-конца или рядом с ним; средней части фермента и их комбинации.

Комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может служить для модификации субъекта.

Субъект может представлять собой целевую нуклеиновую кислоту, ген, хромосому или белок.

Например, комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может приводить к итоговой регуляции (например, к ингибированию, подавлению, снижению, усилению или стимуляции) экспрессии представляющего интерес белка, к удалению белка или экспрессии нового белка.

В данном случае комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может действовать на уровне ДНК, РНК, гена или хромосомы.

Комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может действовать на стадиях транскрипции и трансляции гена.

Комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может действовать на уровне белка.

1. Направляющие нуклеиновые кислоты.

Направляющая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая способна распознавать целевые нуклеиновую кислоту, ген, хромосому или белок и образует комплекс направляющая нуклеиновая кислота-белок.

В данном случае направляющая нуклеиновая кислота сконструирована для распознавания или нацеливания на нуклеиновую кислоту, ген, хромосому или белок, на которые нацеливается комплекс направляющая нуклеиновая кислота-белок.

Направляющая нуклеиновая кислота может присутствовать в форме ДНК, РНК или смеси ДНК/РНК и имеет последовательность нуклеиновой кислоты из 5-150 оснований.

Направляющая нуклеиновая кислота может присутствовать в линейной или кольцевой форме.

Направляющая нуклеиновая кислота может представлять собой одну непрерывную последовательность нуклеиновой кислоты.

Например, одной непрерывной последовательностью нуклеиновой кислоты может быть $(N)_m$, где N представляет собой A, T, C или G, или A, U, C или G, и m представляет собой целое число от 1 до 150.

Направляющая нуклеиновая кислота может представлять собой две или более непрерывных последовательности нуклеиновой кислоты.

Например, две или более непрерывных последовательности нуклеиновой кислоты могут представлять собой $(N)_m$ и $(N)_o$, где N представляет собой A, T, C или G, или A, U, C или G, m и o представляют собой целое число от 1 до 150, и могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать один или более доменов.

В данном случае домены могут представлять собой без ограничения направляющий домен, первый комплементарный домен, линкерный домен, второй комплементарный домен, проксимальный домен или хвостовой домен.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать два или более доменов, которые могут быть повторами одинаковых доменов или могут быть разными доменами.

Домены будут описаны ниже.

i) Направляющий домен.

Термин "направляющий домен" представляет собой домен с комплементарной направляющей последовательностью, которая способна образовывать комплементарную связь с целевой последовательностью в целевом гене или нуклеиновой кислоте, и служит для специфического взаимодействия с целевым геном или нуклеиновой кислотой.

Направляющая последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности в целевом гене или нуклеиновой кислоте, которая характеризуется, например, по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или больше комплементарностью или полной комплементарностью.

Направляющий домен может представлять собой последовательность из 5-50 оснований.

В качестве примера направляющий домен может представлять собой последовательность из 5-50, 10-50, 15-50, 20-50, 25-50, 30-50, 35-50, 40-50 или 45-50 оснований.

В качестве другого примера, направляющий домен может представлять собой последовательность из 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 или 45-50 оснований.

Направляющий домен может иметь направляющую последовательность.

Направляющая последовательность может представлять собой комплементарную последовательность оснований, которая может образовывать комплементарную связь с целевой последовательностью в целевом гене или нуклеиновой кислоте.

Направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности в целевом гене или нуклеиновой кислоте, которая характеризуется, например, по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или больше комплементарностью или полной комплементарностью.

Направляющая последовательность может представлять собой последовательность из 5-50 оснований.

В качестве примера направляющий домен может представлять собой последовательность из 5-50, 10-50, 15-50, 20-50, 25-50, 30-50, 35-50, 40-50 или 45-50 оснований.

В качестве другого примера направляющая последовательность может представлять собой последовательность из 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 или 45-50 оснований.

Кроме того, направляющий домен может включать направляющую последовательность и дополнительную последовательность оснований.

Дополнительная последовательность оснований может быть использована для улучшения или снижения функции направляющего домена.

Дополнительная последовательность оснований может быть использована для улучшения или снижения функции направляющей последовательности.

Дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1-35 оснований.

В одном примере дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 5-35, 10-35, 15-35, 20-35, 25-35 или 30-35 оснований.

В качестве другого примера, дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30 или 30-35 оснований.

Дополнительная последовательность оснований может быть расположена на 5'-конце направляющей последовательности.

Дополнительная последовательность оснований может быть расположена на 3'-конце направляющей последовательности.

ii) Первый комплементарный домен.

Термин "первый комплементарный домен" представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, включающую последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную второму комплементарному домену и обладающую достаточной степенью комплементарности, чтобы образовывать двойную нить со вторым комплементарным доменом.

Первый комплементарный домен может представлять собой последовательность из 5-35 оснований.

В качестве примера первый комплементарный домен может представлять собой последовательность из 5-35, 10-35, 15-35, 20-35, 25-35 или 30-35 оснований.

В качестве другого примера первый комплементарный домен может представлять собой последовательность из 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30 или 30-35 оснований.

iii) Линкерный домен.

Термин "линкерный домен" представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, соединяющую два или более доменов, которые являются двумя или более идентичными или разными доменами. Линкерный домен может быть соединен с двумя или более доменами ковалентной связью или нековалентной связью или может соединять два или более доменов ковалентной связью или нековалентной связью.

Линкерный домен может представлять собой последовательность из 1-30 оснований.

В одном примере линкерный домен может представлять собой последовательность из 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25 или 25-30 оснований.

В качестве другого примера, линкерный домен может представлять собой последовательность из 1-30, 5-30, 10-30, 15-30, 20-30 или 25-30 оснований.

iv) Второй комплементарный домен.

Термин "второй комплементарный домен" представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, включающую последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную первому комплементарному домену, и обладающую достаточной степенью комплементарности, чтобы образовывать двойную нить с первым комплементарным доменом.

Второй комплементарный домен может иметь последовательность оснований, комплементарную первому комплементарному домену, и последовательность оснований, не являющуюся комплементарной первому комплементарному домену, например, последовательность оснований, не образующую двойную нить с первым комплементарным доменом, и может иметь более длинную последовательность оснований, чем у первого комплементарного домена.

Второй комплементарный домен может иметь последовательность из 5-35 оснований.

В качестве примера второй комплементарный домен может представлять собой последовательность из 1-5, 35-10, 35-15, 35-20, 35-25, 35-30 или 35-35 оснований.

В качестве другого примера второй комплементарный домен может представлять собой последовательность из 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30 или 30-35 оснований.

v) Проксимальный домен.

Термин "проксимальный домен" представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, расположенную смежно со вторым комплементарным доменом.

Проксимальный домен может иметь комплементарную последовательность оснований и может быть образован в виде двойной нити за счет комплементарной последовательности оснований.

Проксимальный домен может представлять собой последовательность из 1-20 оснований.

В одном примере проксимальный домен может представлять собой последовательность из 1-20, 5-20, 10-20 или 15-20 оснований.

В качестве другого примера, проксимальный домен может представлять собой последовательность из 1-5, 5-10, 10-15 или 15-20 оснований.

vi) Хвостовой домен.

Термин "хвостовой домен" представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, расположенную в одном или нескольких концах с обоих концов направляющей нуклеиновой кислоты.

Хвостовой домен может иметь комплементарную последовательность оснований и может быть образован в виде двойной нити за счет комплементарной последовательности оснований.

Хвостовой домен может представлять собой последовательность из 1-50 оснований.

В качестве примера хвостовой домен может представлять собой последовательность из 5-50, 10-50, 15-50, 20-50, 25-50, 30-50, 35-50, 40-50 или 45-50 оснований.

В качестве другого примера, хвостовой домен может представлять последовательность из 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 или 45-50 оснований.

При этом часть или все из последовательностей нуклеиновой кислоты включены в домены, то есть направляющий домен, первый комплементарный домен, линкерный домен, второй комплементарный домен, проксимальный домен и хвостовой домен могут избирательно или дополнительно содержать химическую модификацию.

Химическая модификация может представлять собой без ограничения метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, фосфоротиоатную связь, закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат (MS) или 2'-О-метил-3'-тиоРАСЕ (MSP).

Направляющая нуклеиновая кислота включает один или более доменов. Направляющая нуклеиновая кислота может включать направляющий домен. Направляющая нуклеиновая кислота может включать первый комплементарный домен. Направляющая нуклеиновая кислота может включать линкерный домен. Направляющая нуклеиновая кислота может включать второй комплементарный домен. Направляющая нуклеиновая кислота может включать проксимальный домен. Направляющая нуклеиновая кислота может включать хвостовой домен. В данном случае это могут быть 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше доменов.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше направляющих доменов.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше первых комплементарных доменов.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше линкерных доменов.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше вторых комплементарных доменов.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше проксимальных доменов.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше хвостовых доменов.

В данном случае в направляющей нуклеиновой кислоте один тип домена может быть дублирован.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать несколько доменов с дублированием или без нее.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать один и тот же тип домена. В данном случае один и тот же тип домена может иметь одинаковую последовательность нуклеиновой кислоты или различные последовательности нуклеиновой кислоты.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать два типа доменов. В данном случае два разных типа доменов могут иметь разные последовательности нуклеиновой кислоты или одинаковую последовательность нуклеиновой кислоты.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать три типа доменов. В данном случае три разных типа доменов могут иметь разные последовательности нуклеиновой кислоты или одинаковую последовательность нуклеиновой кислоты.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать четыре типа доменов. В данном случае четыре разных типа доменов могут иметь разные последовательности нуклеиновой кислоты или одинаковую последовательность нуклеиновой кислоты.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать пять типов доменов. В данном случае пять разных типов доменов могут иметь разные последовательности нуклеиновой кислоты или одинаковую последовательность нуклеиновой кислоты.

Направляющая нуклеиновая кислота может включать шесть типов доменов. В данном случае шесть разных типов доменов могут иметь разные последовательности нуклеиновой кислоты или одинаковую последовательность нуклеиновой кислоты.

Например, направляющая нуклеиновая кислота может состоять из [направляющего домена]-[первого комплементарного домена]-[линкерного домена]-[второго комплементарного домена]-[линкерного домена]-[направляющего домена]-[первого комплементарного домена]-[линкерного домена]-[второго комплементарного домена]. В данном случае два направляющих домена могут включать направляющие последовательности для разных или одинаковых целей, при этом два первых комплементарных домена и два вторых комплементарных домена могут иметь одинаковые или разные последовательности нуклеиновой кислоты. Если направляющие домены включают направляющие последовательности для разных целей, то направляющие нуклеиновые кислоты могут специфически связываться с двумя разными целями, и в данном случае специфические связывания могут быть выполнены одновременно или последовательно. Кроме того, линкерные домены могут быть расщеплены специфическими ферментами, и направляющие нуклеиновые кислоты могут быть разделены на две или три части в присутствии специфических ферментов.

В качестве конкретного примера направляющей нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим

изобретением ниже будет описана gRNA.

Термин "gRNA" относится к нуклеиновой кислоте, способной специфически нацеливаться на комплекс gRNA-фермент CRISPR, то есть комплекс CRISPR, в отношении целевого гена или нуклеиновой кислоты. Кроме того, gRNA представляет собой специфическую для нуклеиновой кислоты РНК, которая может связываться с ферментом CRISPR и направлять фермент CRISPR на целевые ген или нуклеиновую кислоту.

gRNA может включать несколько доменов. Из-за каждого домена взаимодействия могут происходить в трехмерной структуре или активной форме нити gRNA, или между этими нитями.

gRNA можно назвать одонитевой gRNA (одной молекулой РНК) или двухнитевой gRNA (включающей более одной, как правило, две отдельных молекулы РНК).

В одном иллюстративном варианте осуществления одонитевая gRNA может включать направляющий домен, то есть домен, включающий направляющую последовательность, способную образовывать комплементарную связь с целевыми геном или нуклеиновой кислотой; первый комплементарный домен; линкерный домен; второй комплементарный домен, домен, имеющий последовательность, комплементарную последовательности первого комплементарного домена, за счет чего образуется двухнитевая нуклеиновая кислота с первым комплементарным доменом; проксимальный домен и необязательно хвостовой домен в 5'-3'-направлении.

В другом варианте осуществления двухнитевая gRNA может включать первую нить, которая включает направляющий домен, то есть домен, включающий направляющую последовательность, способную образовывать комплементарную связь с целевыми геном или нуклеиновой кислотой и первым комплементарным доменом; и вторую нить, которая включает второй комплементарный домен, домен, имеющий последовательность, комплементарную последовательности первого комплементарного домена, за счет чего образуется двухнитевая нуклеиновая кислота с первым комплементарным доменом; проксимальный домен и необязательно хвостовой домен в 5'-3'-направлении.

В данном случае первая нить может быть названа crRNA, а вторая нить может быть названа tracrRNA. crRNA может включать направляющий домен и первый комплементарный домен, а tracrRNA может включать второй комплементарный домен, проксимальный домен и необязательно хвостовой домен.

В следующем варианте осуществления одонитевая gRNA может включать направляющий домен, то есть домен, включающий направляющую последовательность, способную образовывать комплементарную связь с целевыми геном или нуклеиновой кислотой; первый комплементарный домен; второй комплементарный домен и домен, имеющий последовательность, комплементарную последовательности первого комплементарного домена, за счет чего образуется двухнитевая нуклеиновая кислота с первым комплементарным доменом в 5'-3'-направлении.

i) Направляющий домен.

Направляющий домен включает комплементарную направляющую последовательность, способную образовывать комплементарную связь с целевой последовательностью в целевом гене или нуклеиновой кислоте. Направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая характеризуется комплементарностью с целевой последовательностью в целевых гене или нуклеиновой кислоте, например, по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или большей комплементарностью или полной комплементарностью. Считается, что направляющий домен позволяет комплексу gRNA-Cas, то есть комплексу CRISPR, специфически взаимодействовать с целевыми геном или нуклеиновой кислотой.

Направляющий домен может представлять собой последовательность из 5-50 оснований.

В иллюстративном варианте осуществления направляющий домен может представлять собой последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В иллюстративном варианте осуществления направляющий домен может включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В данном случае направляющий домен может включать направляющую последовательность.

Направляющая последовательность может представлять собой комплементарную последовательность оснований, способную образовывать комплементарную связь с целевой последовательностью в целевых гене или нуклеиновой кислоте.

Направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности в целевых гене или нуклеиновой кислоте, которая характеризуется, например, по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или большей комплементарностью или полной комплементарностью.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевому гену, то есть целевой последовательности ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, такого как ген FAD, предпочтительно ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 или ген FAD8, которая характеризуется, например, по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%, или больше комплементарностью или полной комплементарностью.

Направляющая последовательность может представлять собой последовательность из 5-50 основа-

ний.

В иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может представлять собой последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD2, которая представляет собой последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD3, которая представляет собой последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD6, которая представляет собой последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD7, которая представляет собой последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD8, которая представляет собой последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В данном случае целевые последовательности целевых генов, то есть ассоциированных с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот факторов, таких как ген FAD2, для направляющей последовательности приведены выше в табл. 1, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

В данном случае направляющий домен может включать направляющую последовательность и дополнительную последовательность оснований.

Дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1-35 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 оснований.

Например, дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из одного основания гуанина (G), или последовательность из двух оснований GG.

Дополнительная последовательность оснований может быть расположена на 5'-конце направляющей последовательности.

Дополнительная последовательность оснований может быть расположена на 3'-конце направляющей последовательности.

В частности, часть или все из последовательностей оснований направляющего домена могут включать химическую модификацию. Химическая модификация может представлять собой метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, фосфоротиоатную связь, закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат (MS) или 2'-О-метил-3'-тиоPASE (MSP), при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

ii) Первый комплементарный домен.

Первый комплементарный домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную второму комплементарному домену и обладающую достаточной степенью комплементарности, чтобы образовывать двойную нить со вторым комплементарным доменом.

В данном случае первый комплементарный домен может представлять собой последовательность из 5-35 оснований. Первый комплементарный домен может включать последовательность из 5-35 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления первый комплементарный домен может представлять собой последовательность из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В другом варианте осуществления первый комплементарный домен может включать последовательность из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

Первый комплементарный домен может характеризоваться гомологией с природным первым комплементарным доменом или может быть получен из природного первого комплементарного домена. Кроме того, первый комплементарный домен может иметь отличие в последовательности оснований первого комплементарного домена в соответствии с видами, существующими в природе, может быть получен из первого комплементарного домена, содержащегося у видов, существующих в природе, или

может характеризоваться частичной или полной гомологией с первым комплементарным доменом, содержащимся у видов, существующих в природе.

В одном иллюстративном варианте осуществления первый комплементарный домен может характеризоваться частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей или полной гомологией с первым комплементарным доменом *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* или *Neisseria meningitidis*, или с первым комплементарным доменом, полученным из него.

Например, если первый комплементарный домен представляет собой первый комплементарный домен *Streptococcus pyogenes* или первый комплементарный домен, полученный из него, то первый комплементарный домен может представлять собой 5'-GUUUUAGAGCUA-3' (SEQ ID NO: 42) или последовательность оснований, характеризующуюся частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей или полной гомологией с 5'-GUUUUAGAGCUA-3' (SEQ ID NO: 42).

В данном случае первый комплементарный домен может дополнительно включать (X)_n, что дает 5'-GUUUUAGAGCUA(X)_n-3' (SEQ ID NO: 42). X может быть выбран из группы, состоящей из оснований A, T, U и G, и n может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 5 до 15. В данном случае (X)_n может иметь n повторов одного и того же основания или комбинацию n оснований A, T, U и G.

В другом варианте осуществления, если первый комплементарный домен представляет собой первый комплементарный домен *Campylobacter jejuni* или первый комплементарный домен, полученный из него, то первый комплементарный домен может представлять собой 5'-GUUUUAGUCCCUUUUAAAUUUCUU-3' (SEQ ID NO: 43) или последовательность оснований, характеризующуюся частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей или полной гомологией с 5'-GUUUUAGUCCCUUUUAAAUUUCUU-3' (SEQ ID NO: 43).

В данном случае первый комплементарный домен может дополнительно включать (X)_n, что дает 5'-GUUUUAGUCCCUUUUAAAUUUCUU(X)_n-3' (SEQ ID NO: 43). X может быть выбран из группы, состоящей из оснований A, T, U и G, и n может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 5 до 15. В данном случае (X)_n может иметь n повторов одного и того же основания или комбинацию n оснований A, T, U и G.

В другом варианте осуществления первый комплементарный домен может характеризоваться частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей или полной гомологией с первым комплементарным доменом

Parcubacteria bacterium

(GWC2011_GWC2_44_17), *Lachnospiraceae bacterium* (MC2017), *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium* (GW2011_GWA_33_10), *Acidaminococcus sp.* (BV3L6), *Porphyromonas macacae*, *Lachnospiraceae bacterium* (ND2006), *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, *Moraxella bovoculi* (237), *Smihella sp.* (SC_KO8D17), *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae bacterium* (MA2020), *Francisella novicida* (U112), *Candidatus Methanoplasma termitum* или *Eubacterium eligens*,

или первым комплементарным доменом, полученным из них.

Например, если первый комплементарный домен представляет собой первый комплементарный домен *Parcubacteria bacterium* или первый комплементарный домен, полученный из него, то первый комплементарный домен может представлять собой 5'-UUUGUAGAU-3' или последовательность оснований, характеризующуюся частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-UUUGUAGAU-3'.

В данном случае первый комплементарный домен может дополнительно включать (X)_n, что дает 5'-(X)_nUUUGUAGAU-3'.

X может быть выбран из группы, состоящей из оснований A, T, U и G, и n может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 1 до 5. В данном случае (X)_n может иметь n повторов одного и того же основания или комбинацию n оснований A, T, U и G.

В частности, часть или все из последовательностей оснований первого комплементарного домена могут иметь химическую модификацию. Химическая модификация может представлять собой метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, фосфоротиоатную связь, закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат (MS) или 2'-О-метил-3'-тиоPASE (MSP), при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

iii) Линкерный домен.

Линкерный домен представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, соединяющую два или более доменов, которые представляет собой два или более идентичных или разных домена. Линкерный домен может быть соединен с двумя или более доменами ковалентной связью или нековалентной связью или может соединять два или более доменов ковалентной или нековалентной связью.

Линкерный домен может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, соединяющую первый комплементарный домен со вторым комплементарным доменом с получением однонитевой gRNA.

Линкерный домен может быть соединен с первым комплементарным доменом и вторым комплементарным доменом ковалентной или нековалентной связью.

Линкерный домен может соединять первый комплементарный домен со вторым комплементарным доменом ковалентной или нековалентной связью.

Линкерный домен может представлять собой последовательность из 1-30 оснований. Линкерный домен может включать последовательность из 1-30 оснований.

В иллюстративном варианте осуществления линкерный домен может представлять собой последовательность из 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25 или 25-30 оснований.

В иллюстративном варианте осуществления линкерный домен может включать последовательность из 1-5, 10-15, 15-20, 20-25 или 25-30 оснований.

Линкерный домен является подходящим для использования в молекуле однонитевой gRNA и может быть использован для получения однонитевой gRNA, соединяясь с первой нитью и второй нитью двухнитевой gRNA или соединяя первую нить со второй нитью ковалентной или нековалентной связью. Линкерный домен может быть использован для получения однонитевой gRNA, будучи соединенным с crRNA и tracrRNA двухнитевой gRNA или соединяя crRNA с tracrRNA ковалентной или нековалентной связью.

Линкерный домен может характеризоваться гомологией с природной последовательностью, например, частичной последовательностью tracrRNA, или может быть получен из нее.

В частности, часть или все из последовательностей оснований линкерного домена могут иметь химическую модификацию. Химическая модификация может представлять собой метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, фосфоротиоатную связь, закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат (MS) или 2'-О-метил-3'-тиоPASE (MSP), при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

iv) Второй комплементарный домен.

Второй комплементарный домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную первому комплементарному домену, и обладает достаточной степенью комплементарности, чтобы образовывать двойную нить с первым комплементарным доменом. Второй комплементарный домен может включать последовательность оснований, комплементарную первому комплементарному домену, и последовательность оснований, не являющуюся комплементарной первому комплементарному домену, например, последовательность оснований, не образующую двойную нить с первым комплементарным доменом, и может иметь более длинную последовательность оснований, чем у первого комплементарного домена.

В данном случае второй комплементарный домен может представлять собой последовательность из 5-35 оснований. Первый комплементарный домен может включать последовательность из 5-35 оснований.

В иллюстративном варианте осуществления второй комплементарный домен может представлять собой последовательность из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В иллюстративном варианте осуществления второй комплементарный домен может включать последовательность из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

Кроме того, второй комплементарный домен может характеризоваться гомологией с природным вторым комплементарным доменом или может быть получен из природного второго комплементарного домена. Кроме того, второй комплементарный домен может иметь отличие в последовательности оснований второго комплементарного домена в соответствии с видами, существующими в природе, может быть получен из второго комплементарного домена, содержащегося у видов, существующих в природе, или может характеризоваться частичной или полной гомологией со вторым комплементарным доменом, содержащимся у видов, существующих в природе.

В иллюстративном варианте осуществления второй комплементарный домен может характеризоваться частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей или полной гомологией со вторым комплементарным доменом *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* или *Neisseria meningitidis* или со вторым комплементарным доменом, полученным из него.

Например, если второй комплементарный домен представляет собой второй комплементарный домен *Streptococcus pyogenes* или второй комплементарный домен, полученный из него, то второй комплементарный домен может представлять собой 5'-UAGCAAGUUAAAAU-3' (SEQ ID NO: 44), или последовательность оснований, характеризующуюся частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-UAGCAAGUUAAAAU-3' (SEQ ID NO: 44), (подчеркнута последовательность оснований, образующая двойную нить с первым комплементарным доменом). В данном случае второй комплементарный домен может дополнительно включать $(X)_n$ и/или $(X)_m$, что дает

5'-(X)_nUAGCAAGUUAAAAU(X)_m-3' (SEQ ID NO: 44).

X может быть выбран из группы, состоящей из оснований A, T, U и G, и каждый из n и m может представлять собой количество оснований, при этом n может представлять собой целое число от 1 до 15, и m может представлять собой целое число от 1 до 6. В данном случае (X)_n может иметь n повторов одного и того же основания или комбинацию n оснований A, T, U и G. Кроме того, (X)_m может представлять собой m повторов одного и того же основания или смесь m оснований A, T, U и G.

В качестве другого примера, если второй комплементарный домен представляет собой второй комплементарный домен *Samruylobacter jejuni* или второй комплементарный домен, полученный из него, то второй комплементарный домен может представлять собой 5'-AAGAAAUUUAAAAAGGGACUAAAAU-3' (SEQ ID NO: 45), или последовательность оснований, характеризующуюся частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-AAGAAAUUUAAAAAGGGACUAAAAU-3' (SEQ ID NO: 45), (подчеркнута последовательность оснований, образующая двойную нить с первым комплементарным доменом). В данном случае второй комплементарный домен может дополнительно включать (X)_n и/или (X)_m, что дает 5'-(X)_nAAGAAAUUUAAAAAGGGACUAAAAU(X)_m-3' (SEQ ID NO: 45).

X может быть выбран из группы, состоящей из оснований A, T, U и G, и каждый из n и m может представлять собой количество оснований, при этом n может представлять собой целое число от 1 до 15, и m может представлять собой целое число от 1 до 6. В данном случае (X)_n может иметь n повторов одного и того же основания или комбинацию n оснований A, T, U и G. Кроме того, (X)_m может представлять собой m повторов одного и того же основания или комбинацию m оснований A, T, U и G.

В другом варианте осуществления первый комплементарный домен может характеризоваться частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей или полной гомологией с первым комплементарным доменом

Например, если второй комплементарный домен представляет собой второй комплементарный домен *Parcubacteria bacterium* или второй комплементарный домен, полученный из него, то второй комплементарный домен может представлять собой

Parcubacteria bacterium
(GWC2011_GWC2_44_17), *Lachnospiraceae bacterium* (MC2017), *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium* (GW2011_GWA_33_10), *Acidaminococcus sp.* (BV3L6), *Porphyrmonas macacae*, *Lachnospiraceae bacterium* (ND2006), *Porphyrmonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, *Moraxella bovoculi* (237), *Smiihella sp.* (SC_KO8D17), *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae bacterium* (MA2020), *Francisella novicida* (U112), *Candidatus Methanoplasma termitum* или *Eubacterium eligens*,

или первым комплементарным доменом, полученным из них.

Например, если второй комплементарный домен представляет собой второй комплементарный домен *Parcubacteria bacterium* или второй комплементарный домен, полученный из него, то второй комплементарный домен может представлять собой 5'-AAAUUCUACU-3' (SEQ ID NO: 46), или последовательность оснований, характеризующуюся частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-AAAUUCUACU-3' (SEQ ID NO: 46) (подчеркнута последовательность оснований, образующая двойную нить с первым комплементарным доменом). В данном случае второй комплементарный домен может дополнительно включать (X)_n и/или (X)_m, что дает 5'-(X)_nAAAUUCUACU(X)_m-3' (SEQ ID NO: 46).

X может быть выбран из группы, состоящей из оснований A, T, U и G, и каждый из n и m может представлять собой количество оснований, при этом n может представлять собой целое число от 1 до 10, и m может представлять собой целое число от 1 до 6. В данном случае (X)_n может иметь n повторов одного и того же основания или комбинацию n оснований A, T, U и G. Кроме того, (X)_m может представлять собой m повторов одного и того же основания или смесь m оснований A, T, U и G.

В частности, часть или все из последовательностей оснований второго комплементарного домена могут иметь химическую модификацию. Химическая модификация может представлять собой метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, фосфоротиоатную связь, закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат (MS) или 2'-О-метил-3'-тиоPASE (MSP), при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

v) Проксимальный домен.

Проксимальный домен представляет собой последовательность из 1-20 оснований, расположенную смежно со вторым комплементарным доменом, и при этом домен расположен в направлении 3'-конца по отношению ко второму комплементарному домену. В данном случае проксимальный домен может быть использован для образования двойной нити между ее комплементарными последовательностями оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления проксимальный домен может представлять со-

бой последовательность из 5, 6, 7, 8, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 оснований.

В другом варианте осуществления проксимальным домен может включать последовательность из 5, 6, 7, 8, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 оснований.

Кроме того, проксимальный домен может характеризоваться гомологией с природным проксимальным доменом или может быть получен из природного проксимального домена. Кроме того, проксимальный домен может иметь отличие в последовательности оснований в соответствии с видами, существующими в природе, может быть получен из проксимального домена, содержащегося в видах, существующих в природе, или может характеризоваться частичной или полной гомологией с проксимальным доменом, содержащимся в видах, существующих в природе.

В иллюстративном варианте осуществления проксимальный домен может характеризоваться частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей или полной гомологией с проксимальным доменом *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* или *Neisseria meningitidis*, или проксимальным доменом, полученным из них.

Например, если проксимальный домен является проксимальным доменом *Streptococcus pyogenes* или проксимальным доменом, полученным из него, то проксимальный домен может представлять собой 5'-AAGGCUAGUCCG-3' (SEQ ID NO: 47) или последовательность оснований, характеризующуюся частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-AAGGCUAGUCCG-3' (SEQ ID NO: 47).

В данном случае проксимальный домен может дополнительно включать (X)_n, что дает 5'-AAGGCUAGUCCG(X)_n-3' (SEQ ID NO: 47).

X может быть выбран из группы, состоящей из оснований A, T, U и G, и n может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 1 до 15. В данном случае (X)_n может иметь n повторов одного и того же основания или комбинацию n оснований A, T, U и G.

В качестве другого примера, если проксимальный домен является проксимальным доменом *Campylobacter jejuni* или проксимальным доменом, полученным из него, то проксимальный домен может представлять собой 5'-AAAGAGUUUGC-3' (SEQ ID NO: 48) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-AAAGAGUUUGC-3' (SEQ ID NO: 48).

В данном случае проксимальный домен может дополнительно включать (X)_n, что дает 5'-AAAGAGUUUGC(X)_n-3' (SEQ ID NO: 48).

X может быть выбран из группы, состоящей из оснований A, T, U и G, и n может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 1 до 40. В данном случае (X)_n может иметь n повторов одного и того же основания или комбинацию n оснований A, T, U и G.

В частности, часть или все из последовательностей оснований проксимального домена могут иметь химическую модификацию. Химическая модификация может представлять собой метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, фосфоротиоатную связь, закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат (MS) или 2'-О-метил-3'-тиоРАСЕ (MSP), при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

vi) Хвостовой домен.

Хвостовым доменом является домен, который может быть избирательно добавлен в 3'-конец однонитевой gRNA или двухнитевой gRNA. Хвостовой домен может представлять собой последовательность из 1-50 оснований или включать последовательность из 1-50 оснований. В данном случае хвостовой домен может быть использован для образования двойной нити между ее комплементарными последовательностями оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления хвостовой домен может представлять последовательность из 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 или 45-50 оснований.

В иллюстративном варианте осуществления хвостовой домен может включать последовательность из 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 или 45-50 оснований.

Кроме того, хвостовой домен может характеризоваться гомологией с природным хвостовым доменом или может быть получен из природного хвостового домена. Кроме того, хвостовой домен может иметь отличие в последовательности оснований в соответствии с видами, существующими в природе, может быть получен из хвостового домена, содержащегося в видах, существующих в природе, или может характеризоваться частичной или полной гомологией с хвостовым доменом, содержащимся в видах, существующих в природе.

В одном иллюстративном варианте осуществления хвостовой домен может характеризоваться частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей или полной гомологией с хвостовым доменом *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* или *Neisseria meningitidis* или хвостовым доменом, полученным из них.

Например, если хвостовой домен является хвостовым доменом *Streptococcus pyogenes* или хвостовым доменом, полученным из него, то хвостовой домен может представлять собой 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3' (SEQ ID NO: 49) или последовательность оснований, характеризующуюся частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей гомологией с

5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3' (SEQ ID NO: 49).

В данном случае хвостовым домен может дополнительно включать $(X)_n$, что дает 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC $(X)_n$ -3' (SEQ ID NO: 49).

X может быть выбран из группы, состоящей из оснований A, T, U и G, и n может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 1 до 15. В данном случае $(X)_n$ может иметь n повторов одного и того же основания или комбинацию n оснований, таких как A, T, U и G.

В качестве другого примера, если хвостовой домен является хвостовым доменом *Campylobacter jejuni* или хвостовым доменом, полученным из него, то хвостовой домен может представлять собой 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3' (SEQ ID NO: 50) или последовательность оснований, характеризующуюся частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3' (SEQ ID NO: 50).

В данном случае хвостовой домен может дополнительно включать $(X)_n$, что дает 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU $(X)_n$ -3' (SEQ ID NO: 50).

X может быть выбран из группы, состоящей из оснований A, T, U и G, и n может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 1 до 15. В данном случае $(X)_n$ может иметь n повторов одного и того же основания или комбинацию n оснований A, T, U и G.

В другом варианте осуществления хвостовой домен может включать последовательность из 1-10 оснований на 3'-конце, вовлеченную в *in vitro* или *in vivo* способ транскрипции.

Например, при использовании промотора T7 в *in vitro* транскрипции gRNA хвостовой домен может представлять собой произвольную последовательность оснований, присутствующую на 3'-конце ДНК-матрицы. Кроме того, при использовании промотора U6 в *in vivo* транскрипции хвостовой домен может представлять собой UUUUUU, при использовании промотора H1 в транскрипции хвостовой домен может представлять собой UUUU, а при использовании промотора pol-III хвостовой домен может включать несколько оснований урацила или альтернативных оснований.

В частности, часть или все из последовательностей оснований хвостового домена могут иметь химическую модификацию. Химическая модификация может представлять собой метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, фосфоротиоатную связь, закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат (MS) или 2'-О-метил-3'-тиоPАСЕ (MSP), при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

gRNA может включать множество доменов, описанных выше, и, следовательно, длину последовательности нуклеиновой кислоты можно регулировать в соответствии с доменом, содержащимся в gRNA, и при этом могут происходить взаимодействия в нитях, в трехмерной структуре или активной форме gRNA, или между этими нитями благодаря каждому домену.

gRNA можно назвать одонитевой gRNA (одной молекулой РНК) или двухнитевой gRNA (включающей более одной, как правило, две отдельных молекулы РНК).

Двухнитевая gRNA.

Двухнитевая gRNA состоит из первой нить и второй нитей.

В данном случае первая нить может состоять из 5'-[направляющего домена]-[первого комплементарного домена]-3', а вторая нить может состоять из 5'-[второго комплементарного домена]-[проксимального домена]-3' или 5'-[второго комплементарного домена]-[проксимального домена]-[хвостового домена]-В данном случае первая нить может быть названа sgRNA, а вторая нить может быть названа tracrRNA.

Первая нить.

Направляющий домен.

В первой нити направляющий домен включает комплементарную направляющую последовательность, которая может образовывать комплементарную связь с целевой последовательностью в целевых гене или нуклеиновой кислоте. Направляющая последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности в целевых гене или нуклеиновой кислоте, которая характеризуется, например, по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%, или большей комплементарностью или полной комплементарностью. Считается, что направляющий домен позволяет комплексу gRNA-Cas, то есть комплексу CRISPR, специфически взаимодействовать с целевыми геном или нуклеиновой кислотой.

В данном случае направляющий домен может представлять собой последовательность из 5-50 оснований или включает последовательность из 5-50 оснований. Например, направляющий домен может представлять собой или включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

Кроме того, направляющий домен может включать направляющую последовательность.

В данном случае направляющая последовательность может представлять собой комплементарную последовательность оснований, которая может образовывать комплементарную связь с целевой последовательностью в целевых гене или нуклеиновой кислоте, которая характеризуется, например, по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или большей комплементарностью или полной комплементар-

ностью.

В иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевому гену, то есть целевой последовательности ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, такого как ген FAD, предпочтительно ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 или ген FAD8, которая характеризуется, например, по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или большей комплементарностью или полной комплементарностью.

В данном случае направляющая последовательность может представлять собой последовательность из 5-50 оснований или включать последовательность из 5-50 оснований. Например, направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD2. Направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 5-50 оснований. Например, направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD3. Направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 5-50 оснований. Например, направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD6. Направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 5-50 оснований. Например, направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD7. Направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 5-50 оснований. Например, направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD8. Направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 5-50 оснований. Например, направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В данном случае направляющие последовательности, целевые последовательности целевого гена, то есть ассоциированные с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот факторы, такие как ген FAD2, приведены выше в табл. 1, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

В частности, направляющий домен может включать направляющую последовательность и дополнительную последовательность оснований.

В данном случае дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1-35 оснований. Например, дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления дополнительная последовательность оснований может включать одно основание гуанин (G) или два основания GG.

В данном случае дополнительная последовательность оснований может быть расположена на 5'-конце направляющего домена или на 5'-конце направляющей последовательности.

Дополнительная последовательность оснований может быть расположена на 3'-конце направляющего домена или на 3'-конце направляющей последовательности.

Первый комплементарный домен.

Первый комплементарный домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную второму комплементарному домену второй нити, и представляет собой домен, характеризующийся достаточной степенью комплементарности, чтобы образовывать двойную нить со вторым комплементарным доменом.

В данном случае первый комплементарный домен может представлять собой или включать последовательность из 5-35 оснований. Например, первый комплементарный домен может представлять собой или включать последовательность из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

Первый комплементарный домен может характеризоваться гомологией с природным первым комплементарным доменом или может быть получен из природного первого комплементарного домена. Кроме того, первый комплементарный домен может иметь отличие в последовательности оснований в

соответствии с видами, существующими в природе, может быть получен из первого комплементарного домена, содержащегося в видах, существующих в природе, или может характеризоваться частичной или полной гомологией с первым комплементарным доменом, содержащимся в видах, существующих в природе.

В одном иллюстративном варианте осуществления первый комплементарный домен может характеризоваться частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей или полной гомологией с первым комплементарным доменом *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* или *Neisseria meningitidis*, или с первым комплементарным доменом, полученным из него.

В частности, первый комплементарный домен может включать дополнительную последовательность оснований, которая не подвергается комплементарному связыванию со вторым комплементарным доменом второй нити.

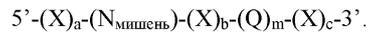
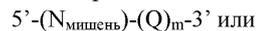
В данном случае дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1-15 оснований. Например, дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1-5, 5-10 или 10-15 оснований.

В частности, часть или все из последовательностей оснований направляющего домена и/или первого комплементарного домена могут иметь химическую модификацию. Химическая модификация может представлять собой метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, фосфоротиоатную связь, закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат (MS) или 2'-О-метил-3'-тиоРАСЕ (MSP), при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

Следовательно, первая нить может состоять из 5'-[направляющего домена]-[первого комплементарного домена]-3', как описано выше.

Кроме того, первая нить необязательно может включать дополнительную последовательность оснований.

В одном примере первая нить может представлять собой



В данном случае $N_{\text{мишень}}$ представляет собой последовательность оснований, способную образовывать комплементарную связь с целевой последовательностью в целевом гене или нуклеиновой кислоте, и участок последовательности оснований, который может быть изменен согласно целевой последовательности в целевом гене или нуклеиновой кислоте.

В одном иллюстративном варианте осуществления $N_{\text{мишень}}$ может представлять собой последовательность оснований, способную образовывать комплементарную связь с целевым геном, то есть целевую последовательность ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, такого как ген FAD, предпочтительно ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 или ген FAD8.

В данном случае $(Q)_m$ представляет собой последовательность оснований, включающую первый комплементарный домен, который может образовывать комплементарную связь со вторым комплементарным доменом второй нити. $(Q)_m$ может представлять собой последовательность, характеризующуюся частичной или полной гомологией с первым комплементарным доменом видов, существующих в природе, а последовательность оснований первого комплементарного домена может быть изменена в соответствии с видами происхождения. Каждый Q может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, и m может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 5 до 35.

Например, если первый комплементарный домен характеризуется частичной или полной гомологией с первым комплементарным доменом *Streptococcus pyogenes* или полученным из *Streptococcus pyogenes* первым комплементарным доменом, то $(Q)_m$ может представлять собой 5'-GUUUUAGAGCUA-3' (SEQ ID NO: 42) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-GUUUUAGAGCUA-3' (SEQ ID NO: 42).

В качестве другого примера, если первый комплементарный домен характеризуется частичной или полной гомологией с первым комплементарным доменом *Campylobacter jejuni* или полученным из *Campylobacter jejuni* первым комплементарным доменом, то $(Q)_m$ может представлять собой 5'-GUUUUAGUCCCUUUUAAAUUUCUU-3' (SEQ ID NO: 43) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-GUUUUAGUCCCUUUUAAAUUUCUU-3' (SEQ ID NO: 43).

В качестве другого примера, если первый комплементарный домен характеризуется частичной или полной гомологией с первым комплементарным доменом *Streptococcus thermophilus* или полученным из *Streptococcus thermophilus* первым комплементарным доменом, то $(Q)_m$ может представлять собой 5'-GUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG-3' (SEQ ID NO: 51) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с

5'-GUUUUAGAGCUGUGUUGUUUCG-3' (SEQ ID NO: 51).

Кроме того, каждый из $(X)_a$, $(X)_b$ и $(X)_c$ избирательно представляет собой дополнительную последовательность оснований, где каждый X может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, и каждый из a, b и c может представлять собой количество оснований, которое равняется 0 или целому числу от 1 до 20.

Вторая нить.

Вторая нить может состоять из второго комплементарного домена, проксимального домена и избирательно может включать хвостовой домен.

Второй комплементарный домен.

Во второй нити второй комплементарный домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную первому комплементарному домену, и обладает достаточной степенью комплементарности, чтобы образовывать двойную нить с первым комплементарным доменом. Второй комплементарный домен может включать последовательность оснований, комплементарную первому комплементарному домену, и последовательность оснований, не являющуюся комплементарной первому комплементарному домену, например, последовательность оснований, не образующую двойную нить с первым комплементарным доменом, и может иметь более длинную последовательность оснований, чем у первого комплементарного домена.

В данном случае второй комплементарный домен может представлять собой последовательность из 5-35 оснований или включать последовательность из 5-35 оснований. Например, второй комплементарный домен может представлять собой или включать последовательность из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

Второй комплементарный домен может характеризоваться гомологией с природным вторым комплементарным доменом или может быть получен из природного второго комплементарного домена. Кроме того, второй комплементарный домен может иметь отличие в его последовательности оснований в соответствии с видами, существующими в природе, может быть получен из второго комплементарного домена, содержащегося в видах, существующих в природе, или может характеризоваться частичной или полной гомологией со вторым комплементарным доменом, содержащимся в видах, существующих в природе.

В одном иллюстративном варианте осуществления второй комплементарный домен может характеризоваться частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей или полной гомологией со вторым комплементарным доменом *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* или *Neisseria meningitidis* или со вторым комплементарным доменом, полученный из них.

В частности, второй комплементарный домен может дополнительно включать дополнительную последовательность оснований, которая не подвергается комплементарному связыванию с первым комплементарным доменом первой нити.

В данном случае дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1-25 оснований. Например, дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1-5, 5-10, 10-15, 15-20 или 20-25 оснований.

Проксимальный домен.

Во второй нити проксимальный домен представляет собой последовательность из 1-20 оснований, и домен, расположенный в направлении по отношению к 3'-концу второго комплементарного домена. Например, проксимальный домен может представлять собой или включать последовательность из 5, 6, 7, 8, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 оснований.

В данном случае проксимальный домен может иметь двухнитевую связь между своими комплементарными последовательностями оснований.

Кроме того, проксимальный домен может характеризоваться гомологией с природным проксимальным доменом или может быть получен из природного проксимального домена. Кроме того, проксимальный домен может иметь отличие в последовательности оснований в соответствии с видами, существующими в природе, может быть получен из проксимального домена видов, существующих в природе, или может характеризоваться частичной или полной гомологией с проксимальным доменом видов, существующих в природе.

В одном иллюстративном варианте осуществления проксимальный домен может характеризоваться частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей или полной гомологией с проксимальным доменом *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* или *Neisseria meningitidis*, или проксимальным доменом, полученным из них.

Хвостовой домен.

В частности, во второй нити хвостовой домен может представлять собой домен, избирательно добавленный в 3'-конец второй нити, и хвостовой домен может представлять собой или включать последовательность из 1-50 оснований. Например, хвостовой домен может представлять собой или включать последовательность из 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 или 45-50 оснований.

В данном случае хвостовой домен может иметь двухнитевую связь между своими комплементарными последовательностями оснований.

Кроме того, хвостовой домен может характеризоваться гомологией с природным хвостовым доменом или может быть получен из природного хвостового домена. Кроме того, хвостовой домен может иметь отличие в последовательности оснований в соответствии с видами, существующими в природе, может быть получен из хвостового домена, содержащегося в видах, существующих в природе, или может характеризоваться частичной или полной гомологией с хвостовым доменом, содержащимся в видах, существующих в природе.

В одном иллюстративном варианте осуществления хвостовой домен может характеризоваться частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей или полной гомологией с хвостовым доменом *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus* или *Neisseria meningitidis* или хвостовым доменом, полученным из них.

В другом варианте осуществления хвостовой домен может включать последовательность из 1-10 оснований на 3'-конце, вовлеченную в *in vitro* или *in vivo* способ транскрипции.

Например, при использовании промотора T7 в *in vitro* транскрипции gRNA хвостовой домен может представлять собой произвольную последовательность оснований, присутствующую на 3'-конце ДНК-матрицы. Кроме того, при использовании промотора U6 в *in vivo* транскрипции хвостовой домен может представлять собой UUUUUU, при использовании промотора H1 в транскрипции хвостовой домен может представлять собой UUUU, а при использовании промотора pol-III хвостовой домен может включать несколько оснований урацила или альтернативных оснований.

В частности, часть или все из каждой последовательности оснований второго комплементарного домена, проксимального домена и/или хвостового домена могут иметь химическую модификацию. Химическая модификация может представлять собой метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, фосфоротиоатную связь, закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат (MS) или 2'-О-метил-3'-тиоРАСЕ (MSP), при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

Следовательно, вторая нить может состоять из 5'-[второго комплементарного домена]-[проксимального домена]-3' или 5'-[второго комплементарного домена]-[проксимального домена]-[хвостового домена]-3', как описано выше.

Кроме того, вторая нить может избирательно включать дополнительную последовательность оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления вторая нить может представлять собой 5'-(Z)_h-(P)_k-3' или 5'-(X)_d-(Z)_h-(X)_e-(P)_k-(X)_f-3'.

В другом варианте осуществления вторая нить может представлять собой 5'-(Z)_h-(P)_k-(F)_i-3' или 5'-(X)_d-(Z)_h-(X)_e-(P)_k-(X)_f-(F)_i-3'.

В данном случае (Z)_h представляет собой последовательность оснований, включающую второй комплементарный домен, который может образовывать комплементарную связь с первым комплементарным доменом первой нити. (Z)_h может представлять собой последовательность, характеризующуюся частичной или полной гомологией со вторым комплементарным доменом видов, существующих в природе, а последовательность оснований второго комплементарного домена может быть модифицирована в соответствии с видами происхождения. Каждый Z может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, и h может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 5 до 50.

Например, если второй комплементарный домен характеризуется частичной или полной гомологией со вторым комплементарным доменом *Streptococcus pyogenes* или вторым комплементарным доменом, полученным из него, то (Z)_h может представлять собой 5'-UAGCAAGUAAAAU-3' (SEQ ID NO: 44) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-UAGCAAGUAAAAU-3' (SEQ ID NO: 44).

В качестве другого примера, если второй комплементарный домен характеризуется частичной или полной гомологией со вторым комплементарным доменом *Campylobacter jejuni* или вторым комплементарным доменом, полученным из него, то (Z)_h может представлять собой 5'-AAGAAAUUAAAAAGGGACUAAAAU-3' (SEQ ID NO: 45) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-AAGAAAUUAAAAAGGGACUAAAAU-3' (SEQ ID NO: 45).

В еще одного примера, если второй комплементарный домен характеризуется частичной или полной гомологией со вторым комплементарным доменом *Streptococcus thermophilus* или вторым комплементарным доменом, полученным из него, то (Z)_h может представлять собой 5'-CGAAACAACACAGCGAGUUAAAAU-3' (SEQ ID NO: 52) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-CGAAACAACACAGCGAGUUAAAAU-3' (SEQ ID NO: 52).

(P)_k представляет собой последовательность оснований, включающую проксимальный домен, который может характеризоваться частичной или полной гомологией с проксимальным доменом видов, су-

существующих в природе, и последовательность оснований проксимального домена может быть модифицирована в соответствии с видами происхождения. Каждый P может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, и k может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 1 до 20.

Например, если проксимальный домен характеризуется частичной или полной гомологией с проксимальным доменом *Streptococcus pyogenes* или проксимальным доменом, полученным из него, то $(P)_k$ может представлять собой 5'-AAGGCUAGUCCG-3' (SEQ ID NO: 47) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-AAGGCUAGUCCG-3' (SEQ ID NO: 47).

В качестве другого примера, если проксимальный домен характеризуется частичной или полной гомологией с проксимальным доменом *Campylobacter jejuni* или проксимальным доменом, полученным из него, то $(P)_k$ может представлять собой 5'-AAAGAGUUUGC-3' (SEQ ID NO: 48) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-AAAGAGUUUGC-3' (SEQ ID NO: 48).

В качестве следующего примера, если проксимальный домен характеризуется частичной или полной гомологией с проксимальным доменом *Streptococcus thermophilus* или проксимальным доменом, полученным из него, то $(P)_k$ может представлять собой 5'-AAGGCUUAGUCCG-3' (SEQ ID NO: 53) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-AAGGCUUAGUCCG-3' (SEQ ID NO: 53).

$(F)_i$ может представлять собой последовательность оснований, включающую хвостовой домен и характеризующуюся частичной или полной гомологией с хвостовым доменом видов, существующих в природе, и последовательность оснований хвостового домена может быть модифицирована в соответствии с видами происхождения. Каждый F может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, а i может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 1 до 50.

Например, если хвостовой домен характеризуется частичной или полной гомологией с хвостовым доменом *Streptococcus pyogenes* или хвостовым доменом, полученным из него, то $(F)_i$ может представлять собой 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3' (SEQ ID NO: 49) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3' (SEQ ID NO: 49).

В качестве другого примера, если хвостовой домен характеризуется частичной или полной гомологией с хвостовым доменом *Campylobacter jejuni* или хвостовым доменом, полученным из него, то $(F)_i$ может представлять собой 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3' (SEQ ID NO: 50) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3' (SEQ ID NO: 50).

В качестве следующего примера, если хвостовой домен характеризуется частичной или полной гомологией с хвостовым доменом *Streptococcus thermophilus* или хвостовым доменом, полученным из него, то $(F)_i$ может представлять собой 5'-UACUCAACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGUGUUUUU-3' (SEQ ID NO: 54) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-UACUCAACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGUGUUUUU-3' (SEQ ID NO: 54).

Кроме того, $(F)_i$ может включать последовательность из 1-10 оснований на 3'-конце, вовлеченную в *in vitro* или *in vivo* способ транскрипции.

Например, при использовании промотора T7 в *in vitro* транскрипции gRNA хвостовой домен может представлять собой произвольную последовательность оснований, присутствующую на 3'-конце ДНК-матрицы. Кроме того, при использовании промотора U6 в *in vivo* транскрипции хвостовой домен может представлять собой UUUUUU, при использовании промотора H1 в транскрипции хвостовой домен может представлять собой UUUU, а при использовании промотора pol-III хвостовой домен может включать несколько оснований урацила или альтернативных оснований.

Кроме того, $(X)_d$, $(X)_e$ и $(X)_f$ могут представлять собой избирательно добавленные последовательности оснований, где каждый X может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, и каждый из d, e и f может представлять собой количество оснований, которое равняется 0 или целому числу от 1 до 20.

Однонитевая gRNA.

Однонитевая gRNA может быть классифицирована на два типа.

i) Однонитевая gRNA.

Во-первых, существует однонитевая gRNA, в которой первая нить или вторая нить двухнитевой gRNA связана с помощью линкерного домена, и в данном случае однонитевая gRNA состоит из 5'-[первой нити]-[линкерного домена]-[второй нити]-3'.

В частности, однонитевая gRNA может состоять из 5'-[направляющего домена]-[первого компле-

ментарного домена]-[линкерного домена]-[второго комплементарного домена]-[проксимального домена]-3' или 5'-[направляющего домена]-[первого комплементарного домена]-[линкерного домена]-[второго комплементарного домена]-[проксимального домена]-[хвостового домена]-3'.

Каждый домен, кроме линкерного домена, аналогичен описанию каждого домена первой и второй нитей двухнитевой gRNA.

Линкерный домен.

В одонитевой gRNA линкерный домен представляет собой домен, соединяющий первую нить и вторую нить, и, в частности, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая соединяет первый комплементарный домен со вторым комплементарным доменом с получением одонитевой gRNA. В данном случае линкерный домен может быть соединен с первым комплементарным доменом и вторым комплементарным доменом ковалентной связью или нековалентной связью, или может соединять первый комплементарный домен со вторым комплементарным доменом ковалентной или нековалентной связью.

Линкерный домен может представлять собой или включать последовательность из 1-30 оснований. Например, линкерный домен может представлять собой или включать последовательность из 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25 или 25-30 оснований.

Линкерный домен является подходящим для использования в молекуле одонитевой gRNA и может быть соединен с первой нитью и второй нитью двухнитевой gRNA или может соединять первую нить со второй нитью ковалентной или нековалентной связью для использования в получении одонитевой gRNA. Линкерный домен может быть соединен с crRNA и tracrRNA двухнитевой gRNA или может соединять crRNA с tracrRNA ковалентной или нековалентной связью для использования в получении одонитевой gRNA.

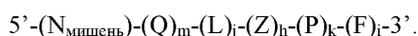
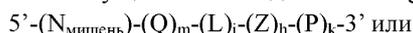
Линкерный домен может характеризоваться гомологией с природной последовательностью, например, частичной последовательностью tracrRNA, или может быть получен из нее.

В частности, часть или все из последовательностей оснований линкерного домена могут иметь химическую модификацию. Химическая модификация может представлять собой метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, фосфорогидрогидратную связь, закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), 2'-О-метил-3'-фосфорогидрат (MS) или 2'-О-метил-3'-тиоPASE (MSP), при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

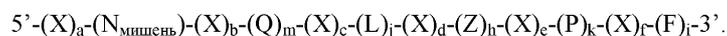
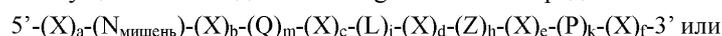
Следовательно, одонитевая gRNA может состоять из 5'-[направляющего домена]-[первого комплементарного домена]-[линкерного домена]-[второго комплементарного домена]-[проксимального домена]-3' или 5'-[направляющего домена]-[первого комплементарного домена]-[линкерного домена]-[второго комплементарного домена]-[проксимального домена]-[хвостового домена]-3', как описано выше.

Кроме того, одонитевая gRNA может избирательно включать дополнительную последовательность оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления одонитевая gRNA может представлять собой



В другом варианте осуществления одонитевая gRNA может представлять собой



В данном случае $N_{\text{мишень}}$ представляет собой последовательность оснований, способную образовывать комплементарную связь с целевой последовательностью в целевых гене или нуклеиновой кислоте, и участок последовательности оснований, способный изменяться согласно целевой последовательности в целевых гене или нуклеиновой кислоте.

В одном иллюстративном варианте осуществления $N_{\text{мишень}}$ представляет собой последовательность оснований, способную образовывать комплементарную связь с целевым геном, то есть целевую последовательность ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, такого как ген FAD, предпочтительно ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 или ген FAD8.

$(Q)_m$ включает последовательность оснований, включающую первый комплементарный домен, который может образовывать комплементарную связь со вторым комплементарным доменом. $(Q)_m$ может представлять собой последовательность, характеризующуюся частичной или полной гомологией с первым комплементарным доменом видов, существующих в природе, а последовательность оснований первого комплементарного домена может быть изменена в соответствии с видами происхождения. Каждый Q может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, и m может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 5 до 35.

Например, если первый комплементарный домен характеризуется частичной или полной гомологи-

ей с первым комплементарным доменом *Streptococcus pyogenes* или первым комплементарным доменом, полученным из него, то $(Q)_m$ может представлять собой 5'-GUUUUAGAGCUA-3' (SEQ ID NO: 42) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-GUUUUAGAGCUA-3' (SEQ ID NO: 42).

В качестве другого примера, если первый комплементарный домен характеризуется частичной или полной гомологией с первым комплементарным доменом *Campylobacter jejuni* или первым комплементарным доменом, полученным из него, то $(Q)_m$ может представлять собой 5'-GUUUUAGUCCCUUUUAAAUUUCUU-3' (SEQ ID NO: 43), или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-GUUUUAGUCCCUUUUAAAUUUCUU-3' (SEQ ID NO: 43).

В качестве следующего примера, если первый комплементарный домен характеризуется частичной или полной гомологией с первым комплементарным доменом *Streptococcus thermophilus* или первым комплементарным доменом, полученным из него, то $(Q)_m$ может представлять собой 5'-GUUUUAGAGCUGUGUUUCG-3' (SEQ ID NO: 51) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-GUUUUAGAGCUGUGUUUCG-3' (SEQ ID NO: 51).

Кроме того, $(L)_j$ представляет собой последовательность оснований, включающую линкерный домен и соединяющую первый комплементарный домен со вторым комплементарным доменом с получением таким образом однонитевой gRNA. Каждый L может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, и j может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 1 до 30.

$(Z)_h$ представляет собой последовательность оснований, включающую второй комплементарный домен, который может иметь комплементарную связь с первым комплементарным доменом. $(Z)_h$ может представлять собой последовательность, характеризующуюся частичной или полной гомологией со вторым комплементарным доменом видов, существующих в природе, а последовательность оснований второго комплементарного домена может быть изменена в соответствии с видами происхождения. Каждый Z может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, и h представляет собой количество оснований, которое может равняться целому числу от 5 до 50.

Например, если второй комплементарный домен характеризуется частичной или полной гомологией со вторым комплементарным доменом *Streptococcus pyogenes* или вторым комплементарным доменом, полученным из него, то $(Z)_h$ может представлять собой 5'-UAGCAAGUAAAAU-3' (SEQ ID NO: 44) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-UAGCAAGUAAAAU-3' (SEQ ID NO: 44).

В качестве другого примера, если второй комплементарный домен характеризуется частичной или полной гомологией со вторым комплементарным доменом *Campylobacter jejuni* или вторым комплементарным доменом, полученным из него, то $(Z)_h$ может представлять собой 5'-AAGAAUUUAAAAGGGACUAAAU-3' (SEQ ID NO: 45) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-AAGAAUUUAAAAGGGACUAAAU-3' (SEQ ID NO: 45).

В еще одного примера, если второй комплементарный домен характеризуется частичной или полной гомологией со вторым комплементарным доменом *Streptococcus thermophilus* или вторым комплементарным доменом, полученным из него, то $(Z)_h$ может представлять собой 5'-CGAAACAACACAGCGAGUUAAAU-3' (SEQ ID NO: 52) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-CGAAACAACACAGCGAGUUAAAU-3' (SEQ ID NO: 52).

$(P)_k$ представляет собой последовательность оснований, включающую проксимальный домен, который может характеризоваться частичной или полной гомологией с проксимальным доменом видов, существующих в природе, и последовательность оснований проксимального домена может быть модифицирована в соответствии с видами происхождения. Каждый P может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, и k может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 1 до 20.

Например, если проксимальный домен характеризуется частичной или полной гомологией с проксимальным доменом *Streptococcus pyogenes* или проксимальным доменом, полученным из него, то $(P)_k$ может представлять собой 5'-AAGGCUAGUCCG-3' (SEQ ID NO: 47) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-AAGGCUAGUCCG-3' (SEQ ID NO: 47).

В качестве другого примера, если проксимальный домен характеризуется частичной или полной гомологией с проксимальным доменом *Campylobacter jejuni* или проксимальным доменом, полученным из него, то $(P)_k$ может представлять собой 5'-AAAGAGUUUGC-3' (SEQ ID NO: 48) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-AAAGAGUUUGC-3' (SEQ ID NO: 48).

В качестве следующего примера, если проксимальный домен характеризуется частичной или полной гомологией с проксимальным доменом *Streptococcus thermophilus* или проксимальным доменом, полученный из него, то $(P)_k$ может представлять собой 5'-AAGGCUUAGUCCG-3' (SEQ ID NO: 53) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-AAGGCUUAGUCCG-3' (SEQ ID NO: 53).

$(F)_i$ может представлять собой последовательность оснований, включающую хвостовой домен и характеризующуюся частичной или полной гомологией с хвостовым доменом видов, существующих в природе, и последовательность оснований хвостового домена может быть модифицирована в соответствии с видами происхождения. Каждый F может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, а i может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 1 до 50.

Например, если хвостовой домен характеризуется частичной или полной гомологией с хвостовым доменом *Streptococcus pyogenes* или хвостовым доменом, полученным из него, то $(F)_i$ может представлять собой 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3' (SEQ ID NO: 49) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3' (SEQ ID NO: 49).

В качестве другого примера, если хвостовой домен характеризуется частичной или полной гомологией с хвостовым доменом *Campylobacter jejuni* или хвостовым доменом, полученным из него, то $(F)_i$ может представлять собой 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3' (SEQ ID NO: 50) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-GGGACUCUGCGGGGUUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU-3' (SEQ ID NO: 50).

В качестве следующего примера, если хвостовой домен характеризуется частичной или полной гомологией с хвостовым доменом *Streptococcus thermophilus* или хвостовым доменом, полученным из него, то $(F)_i$ может представлять собой 5'-UACUCAACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGUGUUUUU-3' (SEQ ID NO: 54) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-UACUCAACUUGAAAAGGUGGCACCGAUUCGGUGUUUUU-3' (SEQ ID NO: 54).

Кроме того, $(F)_i$ может включать последовательность из 1-10 оснований на 3'-конце, вовлеченную в *in vitro* или *in vivo* способ транскрипции.

Например, при использовании промотора T7 в *in vitro* транскрипции gRNA хвостовой домен может представлять собой произвольную последовательность оснований, присутствующую на 3'-конце ДНК-матрицы. Кроме того, при использовании промотора U6 в *in vivo* транскрипции хвостовой домен может представлять собой UUUUUU, при использовании промотора H1 в транскрипции хвостовой домен может представлять собой UUUU, а при использовании промотора роI-III хвостовой домен может включать несколько оснований урацила или альтернативных оснований.

Кроме того, $(X)_a$, $(X)_b$, $(X)_c$, $(X)_d$, $(X)_e$ и $(X)_f$ могут представлять собой избирательно добавленные последовательности оснований, где каждый X может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, и каждый из a, b, c, d, e и f может представлять собой количество оснований, которое равняется 0 или целому числу от 1 до 20.

ii) Однонитевая gRNA.

Во-вторых, однонитевая gRNA может представлять собой однонитевую gRNA, состоящую из направляющего домена, первого комплементарного домена и второго комплементарного домена, и в данном случае однонитевая gRNA может состоять из:

5'-[второго комплементарного домена]-[первого комплементарного домена]-[направляющего домена]-3' или

5'-[второго комплементарного домена]-[линкерного домена]-[первого комплементарного домена]-[направляющего домена]-3'.

Направляющий домен.

В однонитевой gRNA направляющий домен включает комплементарную направляющую последовательность, способную образовывать комплементарную связь с целевой последовательностью в целевом гене или нуклеиновой кислоте. Направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную по целевой последовательности в целевом гене или нуклеиновой кислоте, которая характеризуется, например, по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или большей комплементарностью или полной комплементарностью. Считается, что направляющий домен позволяет комплексу gRNA-Cas, то есть комплексу CRISPR, специфически взаимодействовать с целевым геном или нуклеиновой кислотой.

В данном случае направляющий домен может представлять собой или включать последовательность из 5-50 оснований. Например, направляющий домен может представлять собой или включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

Кроме того, направляющий домен может включать направляющую последовательность.

В данном случае направляющая последовательность может представлять собой комплементарную

последовательность оснований, способную образовывать комплементарную связь с целевой последовательностью в целевых гене или нуклеиновой кислоте, которая характеризуется, например, по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или большей комплементарностью или полной комплементарностью.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевому гену, то есть целевой последовательности ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, такого как ген FAD, предпочтительно ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 или ген FAD8, которая характеризуется, например, по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или большей комплементарностью или полной комплементарностью.

В данном случае направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 5-50 оснований. Например, направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD2. Направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 5-50 оснований. Например, направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD3. Направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 5-50 оснований. Например, направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD6. Направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 5-50 оснований. Например, направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD7. Направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 5-50 оснований. Например, направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления направляющая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD8. Направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 5-50 оснований. Например, направляющая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

В данном случае целевые последовательности целевых генов, то есть ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, такого как ген FAD2, для направляющей последовательности приведены выше в табл. 1, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

В частности, направляющий домен может включать направляющую последовательность и дополнительную последовательность оснований.

В данном случае дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1-35 оснований. Например, дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из одного основания гуанина (G) или последовательность из двух оснований GG.

В данном случае дополнительная последовательность оснований может быть расположена на 5'-конце направляющего домена или на 5'-конце направляющей последовательности.

Дополнительная последовательность оснований может быть расположена на 3'-конце направляющего домена или на 3'-конце направляющей последовательности.

Первый комплементарный домен.

Первый комплементарный домен представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, включающую последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную второму комплементарному домену и обладающую достаточной степенью комплементарности, чтобы образовывать двойную нить со вторым комплементарным доменом.

В данном случае первый комплементарный домен может представлять собой или включать последовательность из 5-35 оснований. Например, первый комплементарный домен может представлять собой или включать последовательность из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

Первый комплементарный домен может характеризоваться гомологией с природным первым комплементарным доменом или может быть получен из природного первого комплементарного домена. Кроме того, первый комплементарный домен может иметь отличие в последовательности оснований первого комплементарного домена в соответствии с видами, существующими в природе, может быть получен из первого комплементарного домена, содержащегося у видов, существующих в природе, или может характеризоваться частичной или полной гомологией с первым комплементарным доменом, содержащимся у видов, существующих в природе.

В одном иллюстративном варианте осуществления первый комплементарный домен может характеризоваться частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей или полной гомологией с первым комплементарным доменом

Parcubacteria bacterium

(GWC2011_GWC2_44_17), *Lachnospiraceae bacterium* (MC2017), *Butyrivibrio proteoclastiicus*, *Peregrinibacteria bacterium* (GW2011_GWA_33_10), *Acidaminococcus sp.* (BV3L6), *Porphyromonas macacae*, *Lachnospiraceae bacterium* (ND2006), *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, *Moraxella bovoculi* (237), *Smihella sp.* (SC_KO8D17), *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae bacterium* (MA2020), *Francisella novicida* (U112), *Candidatus Methanoplasma termitum* или *Eubacterium eligens*,

или первым комплементарным доменом, полученным из них.

В частности, первый комплементарный домен может включать дополнительную последовательность оснований, которая не подвергается комплементарному связыванию со вторым комплементарным доменом.

В данном случае дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1-15 оснований. Например, дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1-5, 5-10 или 10-15 оснований.

Второй комплементарный домен.

Второй комплементарный домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную первому комплементарному домену, и обладает достаточной степенью комплементарности, чтобы образовывать двойную нить с первым комплементарным доменом. Второй комплементарный домен может включать последовательность оснований, комплементарную первому комплементарному домену, и последовательность оснований, не являющуюся комплементарной первому комплементарному домену, например, последовательность оснований, не образующую двойную нить с первым комплементарным доменом, и может иметь более длинную последовательность оснований, чем у первого комплементарного домена.

В данном случае второй комплементарный домен может представлять собой или включать последовательность из 5-35 оснований. Например, второй комплементарный домен может представлять собой последовательность из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

Второй комплементарный домен может характеризоваться гомологией с природным вторым комплементарным доменом или может быть получен из природного второго комплементарного домена. Кроме того, второй комплементарный домен может иметь отличие в последовательности оснований второго комплементарного домена в соответствии с видами, существующими в природе, может быть получен из второго комплементарного домена, содержащегося у видов, существующих в природе, или может характеризоваться частичной или полной гомологией со вторым комплементарным доменом, содержащимся у видов, существующих в природе.

В одном варианте осуществления второй комплементарный домен может характеризоваться частичной, то есть по меньшей мере 50% или большей или полной гомологией со вторым комплементарным доменом

Parcubacteria bacterium

(GWC2011_GWC2_44_17), *Lachnospiraceae bacterium* (MC2017), *Butyrivibrio proteoclastiicus*, *Peregrinibacteria bacterium* (GW2011_GWA_33_10), *Acidaminococcus sp.* (BV3L6), *Porphyromonas macacae*, *Lachnospiraceae bacterium* (ND2006), *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, *Moraxella bovoculi* (237), *Smihella sp.* (SC_KO8D17), *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae bacterium* (MA2020), *Francisella novicida* (U112), *Candidatus Methanoplasma termitum* или *Eubacterium eligens*,

или вторым комплементарным доменом, полученным из них.

В частности, второй комплементарный домен может включать дополнительную последовательность оснований, которая не подвергается комплементарному связыванию с первым комплементарным доменом.

В данном случае дополнительная последовательность оснований может представлять собой после-

довательность из 1-15 оснований. Например, дополнительная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 1-5, 5-10 или 10-15 оснований.

Линкерный домен.

В частности, линкерный домен представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, соединяющую первый комплементарный домен со вторым комплементарным доменом с получением однонитевой gRNA. В данном случае линкерный домен может быть соединен с первым комплементарным доменом и вторым комплементарным доменом ковалентной или нековалентной связью или может соединять первый и второй комплементарные домены ковалентной или нековалентной связью.

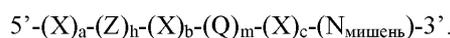
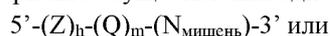
Линкерный домен может представлять собой или включать последовательность из 1-30 оснований. Например, линкерный домен может представлять собой или включать последовательность из 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25 или 25-30 оснований.

В частности, часть или все из последовательностей оснований направляющего домена, первого комплементарного домена, второго комплементарного домена и линкерного домена могут иметь химическую модификацию. Химическая модификация может представлять собой метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, фосфоротиоатную связь, закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), 2'-О-метил-3'-фосфоротиоат (MS) или 2'-О-метил-3'-тиоPASE (MSP), при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

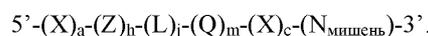
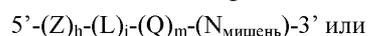
Следовательно, однонитевая gRNA может состоять из 5'-[второго комплементарного домена]-[первого комплементарного домена]-[направляющего домена]-3' или 5'-[второго комплементарного домена]-[линкерного домена]-[первого комплементарного домена]-[направляющего домена]-3', как описано выше.

Кроме того, однонитевая gRNA может избирательно включать дополнительную последовательность оснований.

В одном иллюстративном варианте осуществления однонитевая gRNA может представлять собой



В другом варианте осуществления однонитевая gRNA может представлять собой



В данном случае $N_{\text{мишень}}$ представляет собой последовательность оснований, способную образовывать комплементарную связь с целевой последовательностью в целевом гене или нуклеиновой кислоте, и участок последовательности оснований, который может быть изменен согласно целевой последовательности в целевом гене или нуклеиновой кислоте.

В одном иллюстративном варианте осуществления $N_{\text{мишень}}$ может представлять собой последовательность оснований, способную образовывать комплементарную связь с целевым геном, то есть целевую последовательность ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, такого как ген FAD, предпочтительно ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 или ген FAD8.

$(Q)_m$ представляет собой последовательность оснований, включающую первый комплементарный домен, который может образовывать комплементарную связь со вторым комплементарным доменом второй нити. $(Q)_m$ может представлять собой последовательность, характеризующуюся частичной или полной гомологией с первым комплементарным доменом видов, существующих в природе, а последовательность оснований первого комплементарного домена может быть изменена в соответствии с видами происхождения. Каждый Q может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, и m может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 5 до 35.

Например, если первый комплементарный домен характеризуется частичной или полной гомологией с первым комплементарным доменом *Parcubacteria bacterium* или первым комплементарным доменом, полученным из него, то $(Q)_m$ может представлять собой 5'-UUUGUAGAU-3' или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-UUUGUAGAU-3'.

$(Z)_h$ представляет собой последовательность оснований, включающую второй комплементарный домен, который может образовывать комплементарную связь с первым комплементарным доменом первой нити. $(Z)_h$ может представлять собой последовательность, характеризующуюся частичной или полной гомологией со вторым комплементарным доменом видов, существующих в природе, а последовательность оснований второго комплементарного домена может быть модифицирована в соответствии с видами происхождения. Каждый Z может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, и h может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 5 до 50.

Например, если второй комплементарный домен характеризуется частичной или полной гомологией со вторым комплементарным доменом *Parcubacteria bacterium* или полученным из *Parcubacteria bacterium* вторым комплементарным доменом, то $(Z)_h$ может представлять собой

5'-AAAUUUCUACU-3' (SEQ ID NO: 46) или последовательность оснований, характеризующуюся по меньшей мере 50% или большей гомологией с 5'-AAAUUUCUACU-3' (SEQ ID NO: 46).

Кроме того, (L)_j представляет собой последовательность оснований, включающую линкерный домен, который соединяет первый комплементарный домен со вторым комплементарным доменом. Каждый L может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, и j может представлять собой количество оснований, которое равняется целому числу от 1 до 30.

Кроме того, каждый из (X)_a, (X)_b и (X)_c избирательно представляет собой дополнительную последовательность оснований, где каждый X может быть независимо выбран из группы, состоящей из A, U, C и G, и a, b и c могут представлять собой количество оснований, которое равняется 0 или целому числу от 1 до 20.

2. Редактирующий белок.

Редактирующий белок относится к пептиду, полипептиду или белку которые могут непосредственно связываться или взаимодействовать с нуклеиновой кислотой без непосредственного связывания с ней.

Нуклеиновая кислота может представлять собой нуклеиновую кислоту, содержащуюся в целевых нуклеиновой кислоте, гене или хромосоме.

Нуклеиновая кислота может представлять собой направляющую нуклеиновую кислоту. Редактирующий белок может представлять собой фермент. Редактирующий белок может представлять собой слитый белок.

В данном случае термин "слитый белок" относится к белку, полученному путем слияния фермента с дополнительными доменом, пептидом, полипептидом или белком.

Фермент относится к белку, включающему домен, который способен расщеплять нуклеиновую кислоту, ген, хромосому или белок.

Фермент может представлять собой нуклеазу, протеазу или рестриктазу.

Дополнительные домен, пептид, полипептид или белок могут представлять собой функциональный домен, пептид, полипептид или белок, которые обладают функцией такой же или отличной от такой у фермента.

Слитый белок может включать дополнительный домен, пептид, полипептид или белок в одном или более из N-конца фермента или рядом с ним, C-конца фермента или рядом с ним, в среднем участке фермента и их комбинации.

Слитый белок может включать функциональные домен, пептид, полипептид или белок в одном или более из N-конца фермента или рядом с ним, C-конца фермента или рядом с ним, в среднем участке фермента и их комбинации.

В данном случае функциональный домен, пептид, полипептид или белок могут представлять собой домен, пептид, полипептид или белок с метилазной активностью, деметилазной активностью, активностью активации транскрипции, активностью подавления транскрипции, активностью высвобождения фактора транскрипции, активностью модификации гистонов, активностью расщепления РНК или активностью связывания нуклеиновой кислоты, или метку или репортерный ген для выделения и очистки белка (в том числе пептида), при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

Функциональные домен, пептид, полипептид или белок могут представлять собой дезаминазу.

Метка включает гистидиновую (His) метку, метку V5, метку FLAG, метку гемагглютинаина гриппа (HA), метку Мус, метку VSV-G и тиоредоксиновую (Trx) метку, а репортерный ген включает глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT) β-галактозидазу, β-глюкоронидазу, люциферазу, аутофлуоресцентные белки, в том числе зеленый флуоресцентный белок (GFP), HcRed, DsRed, голубой флуоресцентный белок (CFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) и синий флуоресцентный белок (BFP), при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

Кроме того, функциональные домен, пептид, полипептид или белок могут представлять собой последовательность или сигнал ядерной локализации (NLS) или последовательность или сигнал ядерного экспорта (NES).

NLS может представлять собой NLS большого Т-антигена вируса SV40 с аминокислотной последовательностью PKKKRKV (SEQ ID NO: 55);

NLS, полученный из нуклеоплазмина (например, двучастичный NLS нуклеоплазмина с последовательностью KRPAATKAGQAKKKK) (SEQ ID NO: 56);

c-мус NLS с аминокислотной последовательностью PAAKRVKLD (SEQ ID NO: 57) или RQRRNELKRSP (SEQ ID NO: 58);

hRNPA1 M9 NLS c последовательностью NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY (SEQ ID NO: 59);

последовательность RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV (SEQ ID NO: 60) полученного из импортина-α домена IBB;

последовательности VSRKRPRP (SEQ ID NO: 61) и PPKKARED (SEQ ID NO: 62) Т-белка миомы;

последовательность PQPKKKPL (SEQ ID NO: 63) р53 человека; последовательность SALIKKKKKMAP (SEQ ID NO: 64) c-abl IV мыши;

последовательности DRLRR (SEQ ID NO: 65) и PKQKKRK (SEQ ID NO: 66) вируса гриппа NS1;

последовательность RKLKKKIKKL (SEQ ID NO: 67) антигена вируса 5-гепатита;

последовательность REKKKFLKRR (SEQ ID NO: 68) белка Mx1 мыши;

последовательность KRKGDEVDGVDEVAKKSKK (SEQ ID NO: 69) поли(АДФ-рибоза)-полимеразы человека или последовательность RKCLQAGMNLEARKTKK (SEQ ID NO: 70) рецептора стероидного гормона глюкокортикоида (человека),

при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

Редактирующий белок может включать полный активный фермент.

В данном случае термин "полный активный фермент" относится к ферменту, обладающему той же функцией, что фермент дикого типа, и, например, фермент дикого типа, расщепляющий двойную нить ДНК, обладает полной ферментативной активностью в отношении полного расщепления двойной нити ДНК.

Кроме того, полный активный фермент включает в себя фермент с улучшенной функцией по сравнению с функцией фермента дикого типа, и, например, специфический тип модификации или манипуляции с ферментом дикого типа, расщепляющего двойную нить ДНК, обеспечивает полную ферментативную активность, которая улучшена по сравнению с ферментом дикого типа, то есть активностью расщепления двойной нити ДНК.

Редактирующий белок может включать неполный или частично активный фермент.

В данном случае термин "неполный или частично активный фермент" относится к ферменту, обладающему некоторыми функциями фермента дикого типа, и, например, специфический тип модификации или манипуляции с ферментом дикого типа, расщепляющего двойную нить ДНК, обеспечивает неполную или частичную ферментативную активность расщепления части двойной нити, то есть одинарной нити ДНК.

Редактирующий белок может включать неактивный фермент.

В данном случае термин "неактивный фермент" относится к ферменту, у которого функция фермента дикого типа полностью инактивирована. Например, специфический тип модификации или манипуляции с ферментом дикого типа, расщепляющим двойную нить ДНК, не обладает активностью, поэтому вообще не расщепляет двойную нить ДНК.

Редактирующий белок может представлять собой природный фермент или слитый белок.

Редактирующий белок может присутствовать в форме частично модифицированного природного фермента или слитого белка.

Редактирующий белок может представлять собой искусственно полученный фермент или слитый белок, который не существует в природе.

Редактирующий белок может присутствовать в форме частично модифицированного искусственного фермента или слитого белка, который не существует в природе.

В данном случае модификация может представлять собой замену, удаление, добавление аминокислот, содержащихся в редактирующем белке, или их комбинацию.

Кроме того, модификация может представлять собой замену, удаление, добавление некоторых оснований в последовательность оснований, кодирующую редактирующий белок, или их комбинацию.

В одном иллюстративном варианте осуществления редактирующего белка по настоящему изобретению фермент CRISPR будет описан ниже.

Фермент CRISPR.

Термин "фермент CRISPR" означает основной белковый компонент системы CRISPR-Cas, формирующий комплекс с gRNA, что дает систему CRISPR-Cas.

Фермент CRISPR представляет собой нуклеиновую кислоту или полипептид (или белок) с последовательностью, кодирующей фермент CRISPR, и в качестве примера широко используется фермент CRISPR II типа или фермент CRISPR V типа.

Фермент CRISPR II типа представляет собой Cas9, который может быть получен из различных микроорганизмов, таких как

Streptococcus pyogenes, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Nocardiosis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus*

acidocaldarius, Bacillus pseudomycooides, Bacillus selenitireducens, Exiguobacterium sibiricum, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus salivarius, Microscilla marina, Burkholderiales bacterium, Polaromonas naphthalenivorans, Polaromonas sp., Crocosphaera watsonii, Cyanothece sp., Microcystis aeruginosa, Synechococcus sp., Acetohalobium arabaticum, Ammonifex degensii, Caldicelulosiruptor bescii, Candidatus Desulforudis, Clostridium botulinum, Clostridium difficile, Finegoldia magna, Natranaerobius thermophilus, Pelotomaculum thermopropionicum, Acidithiobacillus caldus, Acidithiobacillus ferrooxidans, Allochromatium vinosum, Marinobacter sp., Nitrosococcus halophilus, Nitrosococcus watsoni, Pseudoalteromonas haloplanktis, Ktedonobacter racemifer, Methanohalobium evestigatum, Anabaena variabilis, Nodularia spumigena, Nostoc sp., Arthrospira maxima, Arthrospira platensis, Arthrospira sp., Lyngbya sp., Microcoleus chthonoplastes, Oscillatoria sp., Petrotoga mobilis, Thermosipho africanus и Acaryochloris marina.

Термин "Cas9" означает фермент, который связывается с gRNA, вследствие чего расщепляет или модифицирует целевую последовательность или местоположение в целевых гене или нуклеиновой кислоте и может состоять из домена HNH, способного расщеплять нить нуклеиновой кислоты, образуя комплементарную связь с gRNA, домена RuvC, способного расщеплять нить нуклеиновой кислоты, образуя комплементарную связь с gRNA, домена REC, распознающего мишень, и домена PI, распознающего PAM. Hiroshi Nishimasu et al. (2014) Cell 156:935-949 ссылаются на специфические структурные характеристики Cas9.

Кроме того, фермент CRISPR V типа может представлять собой Cpf1, который может быть получен из

Streptococcus, Campylobacter, Nitratifractor, Staphylococcus, Parvibaculum, Roseburia, Neisseria, Gluconacetobacter, Azospirillum, Sphaerochaeta, Lactobacillus, Eubacterium, Corynebacter, Carnobacterium, Rhodobacter, Listeria, Paludibacter, Clostridium, Lachnospiraceae, Clostridiaridium, Leptotrichia, Francisella, Legionella, Alicyclobacillus, Methanomethyophilus, Porphyromonas, Prevotella, Bacteroidetes, Helcococcus, Letospira, Desulfovibrio, Desulfonatromum, Opitutaceae, Tubericillus, Bacillus, Brevibacillus, Methylobacterium или Acidaminococcus.

Cpf1 может состоять из домена RuvC, подобного и соответствующего домену RuvC в Cas9, домена Nuc без домена HNH в Cas9, домена REC, распознающего мишень, домена WED и домена PI, распознающих PAM.

Специфические структурные характеристики.

Cpf1 можно найти в Takashi Yamano et al. (2016) Cell 165:949-962.

Фермент CRISPR в Cas9 или белок Cpf1 можно выделить из микроорганизма, существующего в природе, или получить искусственно рекомбинантным способом или способом синтеза.

Фермент CRISPR II типа.

Кристаллическую структуру фермента CRISPR II типа определяли согласно исследованиям двух или более типов молекул природного микробного фермента CRISPR II типа (Jinek et al., Science, 343(6176): 1247997, 2014) и исследованиям Cas9 (SpCas9) *Streptococcus pyogenes* в комплексе с gRNA (Nishimasu et al., Cell, 156:935-949, 2014; и Anders et al., Nature, 2014, doi: 10.1038/nature13579).

Фермент CRISPR II типа включает две доли, то есть доли распознавания (REC) и нуклеазы (NUC), и при этом каждая доля включает несколько доменов.

Доля REC включает домен богатой аргинином мостиковой спирали (BH), домен REC1 и домен REC2.

В данном случае домен BH представляет собой длинный α -спиральный и богатый аргинином участок, а домены REC1 и REC2 играют важную роль в распознавании двойной нити, образованной в gRNA, например, однонитевой gRNA, двухнитевой gRNA или tracrRNA.

Доля NUC включает домен RuvC, домен HNH и домен взаимодействия с PAM (PI). В данном случае домен RuvC охватывает RuvC-подобные домены, или домен HNH используется для включения HNH-подобных доменов.

В данном случае домен RuvC обладает структурным подобием с представителями семейства микроорганизмов, существующего в природе, имеющего фермент CRISPR II типа, и расщепляет одинарную нить, например, не являющуюся комплементарной нить целевых гена или нуклеиновой кислоты, то есть нить, не образующую комплементарную связь с gRNA. В уровне техники домен RuvC иногда называют

доменом RuvCI, доменом RuvCII или доменом RuvCIII, но обычно называют RuvCI, RuvCII или RuvCIII. Например, в случае SpCas9 домен RuvC собирается из каждого из трех отдельных доменов RuvC (RuvC I, RuvCII и RuvCIII), расположенных в последовательностях аминокислот 1-59, 718-769 и 909-1098 в SpCas9 соответственно.

Домен HNH обладает структурным подобием с HNH-эндонуклеазой и расщепляет одинарную нить, например, комплементарную нить целевой молекулы нуклеиновой кислоты, то есть нить, образующую комплементарную связь с gRNA. Домен HNH расположен между мотивами RuvC II и III. Например, в случае SpCas9 домен HNH расположен в аминокислотной последовательности 775-908 в SpCas9.

Домен PI распознает специфическую последовательность оснований в целевых гене или нуклеиновой кислоте, то есть смежный с протоспейсером мотив (PAM), или взаимодействует с PAM. Например, в случае SpCas9 домен PI расположен в последовательности аминокислот от 1099 до 1368 в SpCas9.

В данном случае PAM может варьировать в соответствии с происхождением фермента CRISPR II типа. Например, если фермент CRISPR представляет собой SpCas9, то PAM может представлять собой 5'-NGG-3', если фермент CRISPR представляет собой Cas9 *Streptococcus thermophilus* (StCas9), то PAM может представлять собой 5'-NNAGAAW-3' (W=A или T), если фермент CRISPR представляет собой Cas9 *Neisseria meningitidis* (NmCas9), то PAM может представлять собой 5'-NNNNGATT-3', и если фермент CRISPR представляет собой Cas9 *Campylobacter jejuni* (CjCas9), то PAM может представлять собой 5'-NNNVRYAC-3' (V=G или C или A, R=A или G, Y=C или T), где N может представлять собой A, T, G или C; или A, U, G или C.

Фермент CRISPR V типа.

Фермент CRISPR V типа включает подобные RuvC домены, соответствующие доменам RuvC фермента CRISPR II типа, и может состоять из домена Nuc вместо домена HNH фермента CRISPR II типа, доменов REC и WED, которые распознают мишень, и домена PI, распознающего PAM. Специфические структурные характеристики фермента CRISPR V типа можно найти в Takashi Yamano et al. (2016) Cell 165:949-962.

Фермент CRISPR V типа может взаимодействовать с gRNA, за счет чего образуется комплекс gRNA-фермент CRISPR, то есть комплекс CRISPR, и может обеспечивать направляющей последовательности доступ к целевой последовательности, в том числе к последовательности PAM совместно с gRNA. В данном случае способность фермента CRISPR V типа взаимодействовать с целевыми геном или нуклеиновой кислотой зависит от последовательности PAM.

Последовательность PAM представляет собой последовательность, присутствующую в целевых гене или нуклеиновой кислоте, и может распознаваться доменом PI фермента CRISPR V типа. Последовательность PAM может варьировать в соответствии с происхождением фермента CRISPR V типа. То есть существуют разные последовательности PAM, которые могут специфически распознаваться в зависимости от вида.

В одном примере последовательность PAM, которая распознается CrfI, может представлять собой 5'-TTN-3' (N представляет собой A, T, C или G).

Активность фермента CRISPR.

Фермент CRISPR расщепляет двойную или одинарную нить целевых гена или нуклеиновой кислоты и обладает нуклеазной активностью, вызывающей разрыв или делецию в двойной или одинарной нити. Как правило, фермент CRISPR типа II дикого типа или фермент CRISPR V типа расщепляет двойную нить целевых гена или нуклеиновой кислоты.

Для манипуляции или модификации вышеописанной нуклеазной активности фермента CRISPR с ферментом CRISPR можно осуществлять манипуляцию или его можно модифицировать, при этом такой подвергнутый манипуляции или модификации фермент CRISPR может быть модифицирован в не полностью или частично активный или неактивный фермент.

Не полностью или частично активный фермент.

Фермент CRISPR, подвергнутый модификации с изменением ферментативной активности, за счет чего проявляется неполная или частичная активность, называют никазой.

Термин "никаза" относится к ферменту CRISPR, подвергнутому манипуляции или модификации с расщеплением только одной нити в двойной нити целевых гена или нуклеиновой кислоты, и при этом никаза обладает нуклеазной активностью расщепления одинарной нити, например, нити, которая не является комплементарной или является комплементарной gRNA целевых гена или нуклеиновой кислоты.

Следовательно, для расщепления двойной нити требуется нуклеазная активность двух никаз.

Например, никаза может обладать нуклеазной активностью за счет домена RuvC. То есть никаза может обладать нуклеазной активностью домена HNH, и для этой цели можно осуществлять манипуляцию с доменом HNH или его можно модифицировать.

В одном примере при условии, что фермент CRISPR представляет собой фермент CRISPR II типа, в случае SpCas9, если остаток 840 в аминокислотной последовательности SpCas9 подвергли мутации из гистидина в аланин, то нуклеазная активность домена HNH инактивируется с тем, чтобы использоваться в качестве никазы. Поскольку полученная таким образом никаза обладает нуклеазной активностью домена RuvC, она способна расщеплять нить, которая не образует комплементарную связь с не являющейся

комплементарной нитью целевых гена или нуклеиновой кислоты, то есть gRNA.

В другом иллюстративном варианте осуществления в случае CjCas9, если остаток 559 в аминокислотной последовательности CjCas9 подвергли мутации из гистидина в аланин, то нуклеазная активность домена HNH инактивируется с тем, чтобы использоваться в качестве никазы. Полученная таким образом никаза обладает нуклеазной активностью за счет домена RuvC и таким образом способна расщеплять не являющуюся комплементарной нить целевых гена или нуклеиновой кислоты, то есть нить, которая не образует комплементарную связь с gRNA.

Например, никаза может обладать нуклеазной активностью за счет домена HNH. То есть никаза может обладать нуклеазной активностью домена RuvC, и для этой цели можно осуществлять манипуляцию с доменом RuvC или его можно модифицировать.

В одном примере при условии, что фермент CRISPR представляет собой фермент CRISPR II типа, в одном иллюстративном варианте осуществления в случае SpCas9, если остаток 10 в аминокислотной последовательности SpCas9 подвергли мутации из аспарагиновой кислоты в аланин, то нуклеазная активность домена RuvC инактивируется, чтобы использоваться в качестве никазы. Полученная таким образом никаза обладает нуклеазной активностью домена HNH и таким образом способна расщеплять комплементарную нить целевых гена или нуклеиновой кислоты, то есть нить, которая образует комплементарную связь с gRNA.

В другом иллюстративном варианте осуществления в случае CjCas9, если остаток 8 в аминокислотной последовательности CjCas9 подвергли мутации из аспарагиновой кислоты в аланин, то нуклеазная активность домена RuvC инактивируется с тем, чтобы использоваться в качестве никазы. Полученная таким образом никаза обладает нуклеазной активностью домена HNH и таким образом способна расщеплять комплементарную нить целевых гена или нуклеиновой кислоты, то есть нить, которая образует комплементарную связь с gRNA.

Неактивный фермент.

Фермент CRISPR, который модифицирован с достижением полного отсутствия ферментативной активности, называют неактивным ферментом CRISPR.

Термин "неактивный фермент CRISPR" относится к ферменту CRISPR, который модифицирован с неполным расщеплением двойной нити целевых гена или нуклеиновой кислоты, и при этом неактивный фермент CRISPR обладает нуклеазной неактивностью из-за мутации в домене с нуклеазной активностью фермента дикого типа CRISPR. Неактивным ферментом CRISPR может быть фермент, в котором нуклеазные активности домена RuvC и домена HNH инактивированы.

Например, с неактивным ферментом CRISPR можно осуществлять манипуляцию или его можно модифицировать в домене RuvC и домене HNH с инактивацией нуклеазной активности.

В одном примере при условии, что фермент CRISPR представляет собой фермент CRISPR II типа, в одном иллюстративном варианте осуществления в случае SpCas9, если остатки 10 и 840 в аминокислотной последовательности SpCas9 подвергли мутации из аспарагиновой кислоты и гистидина в аланин соответственно, то нуклеазные активности за счет домена RuvC и домена HNH инактивированы, поэтому двойная нить не может полностью расщеплять двойную нить целевых гена или нуклеиновой кислоты.

В другом иллюстративном варианте осуществления в случае CjCas9, если остатки 8 и 559 в аминокислотной последовательности CjCas9 подвергли мутации из аспарагиновой кислоты и гистидина в аланин, то нуклеазные активности за счет домена RuvC и домена HNH инактивированы, поэтому двойная нить не может полностью расщеплять двойную нить целевых гена или нуклеиновой кислоты.

Другие виды активности.

Фермент CRISPR может обладать эндонуклеазной активностью, экзонуклеазной активностью или хеликазной активностью, то есть способен гибридизоваться со спиральной структурой двухнитевой нуклеиновой кислоты помимо вышеописанной нуклеазной активности.

Кроме того, фермент CRISPR может быть модифицирован с полной, неполной или частичной активацией эндонуклеазной активности, экзонуклеазной активности или хеликазной активности.

Нацеливание фермента CRISPR.

Фермент CRISPR может взаимодействовать с gRNA, за счет чего образуется комплекс gRNA-фермент CRISPR, то есть комплекс CRISPR, и обеспечивает направляющей последовательности доступ к целевой последовательности, в том числе к последовательности PAM совместно с gRNA. В данном случае способность фермента CRISPR взаимодействовать с целевыми геном или нуклеиновой кислотой зависит от последовательности PAM.

Последовательность PAM представляет собой последовательность, присутствующую в целевых генах или нуклеиновой кислоте, которая может распознаваться доменом PI фермента CRISPR. Последовательность PAM может варьировать в зависимости от происхождения фермента CRISPR. То есть существуют различные последовательности PAM, которые могут специфически распознаваться в соответствии с видами.

В одном примере при условии, что фермент CRISPR представляет собой фермент CRISPR II типа, в случае SpCas9 последовательность PAM может представлять собой 5'-NGG-3', 5'-NAG-3' и/или 5'-NGA-3', в случае StCas9 последовательность PAM может представлять

собой 5'-NGGNG-3' и/или 5'-NNAGAAW-3' (W=A или T), в случае NmCas9 последовательность PAM может представлять собой 5'-NNNNGATT-3' и/или 5'-NNNGCTT-3', в случае CjCas9 последовательность PAM может представлять собой 5'-NNNVRYAC-3' (V=G, C или A; R=A или G; Y=C или T), в случае Cas9 *Streptococcus mutans* (SmCas9) последовательность PAM может представлять собой 5'-NGG-3' и/или 5'-NAAR-3' (R=A или G), и в случае Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) последовательность PAM может представлять собой 5'-NNGRR-3', 5'-NNGRRT-3' и/или 5'-NNGRRV-3' (R=A или G; V=G, C или A).

В качестве другого примера при условии, что фермент CRISPR представляет собой фермент CRISPR V типа, в случае Cpf 1 последовательность PAM может представлять собой 5'-TTN-3'.

В данном случае N может представлять собой A, T, G или C или A, U, G или C.

Фермент CRISPR, способный распознавать специфическую последовательность PAM, можно подвергать манипуляции или его модификации с использованием последовательности PAM, которая может специфически распознаваться в соответствии с видами. Например, домен PI из SpCas9 может быть заменен доменом PI из CjCas9 с обеспечением присутствия нуклеазной активности SpCas9 и распознавания CjCas9-специфической последовательности PAM, за счет чего получают SpCas9, распознающий CjCas9-специфическую последовательность PAM. Специфически распознаваемая последовательность PAM может быть изменена путем замены или замещения домена PI.

Мутантный фермент CRISPR.

Фермент CRISPR может быть модифицирован с улучшением или ингибированием различных характеристик, таким как нуклеазная активность, хеликазная активность, способность взаимодействовать с gRNA и способность доступа к целевым гену или нуклеиновой кислоте, например, способность распознавания PAM фермента CRISPR.

Кроме того, мутантный фермент CRISPR может представлять собой фермент CRISPR, который взаимодействует с gRNA с образованием комплекса gRNA-фермент CRISPR, то есть комплекса CRISPR, и является модифицируемым или манипулируемым с улучшением целевой специфичности при достижении целевого гена или нуклеиновой кислоты или локализации в них, в результате чего расщепляется только двойная или одинарная нить целевых гена или нуклеиновой кислоты без расщепления двойной или одинарной нити нецелевых гена или нуклеиновой кислоты, которые частично образуют комплементарную связь с gRNA, и не являющихся целевыми гена или нуклеиновой кислоты, которые не образуют комплементарную связь с ней.

В данном случае эффект расщепления двойной или одинарной нити не являющихся целевыми гена или нуклеиновой кислоты, частично образующих комплементарную связь с gRNA, и нецелевых гена или нуклеиновой кислоты, не образующих комплементарную связь с ней, называют нецелевым эффектом, положением или последовательностью оснований не являющихся целевыми гена или нуклеиновой кислоты, частично образующих комплементарную связь с gRNA, и нецелевых гена или нуклеиновой кислоты, не образующих комплементарную связь с ней, называют нецелевым. В данном случае может наблюдаться одним или более нецелевых эффектов. С другой стороны, эффект расщепления двойной или одинарной нити целевых гена или нуклеиновой кислоты называют целевым эффектом, а локализацию или целевую последовательность целевых гена или нуклеиновой кислоты называют целевой.

Мутантный фермент CRISPR модифицирован в по меньшей мере одной из аминокислот существующего в природе фермента CRISPR и может быть модифицирован, например, улучшен или ингибирован по одной или нескольким из различных характеристик, таких как нуклеазная активность, хеликазная активность, способность взаимодействовать с gRNA, способность достигать целевого гена или нуклеиновой кислоты и целевая специфичность, по сравнению с немодифицированным ферментом CRISPR. В данном случае модификация может представлять собой замену, удаление, добавление аминокислоты или их комбинацию.

В мутантном ферменте CRISPR модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот, расположенных в участке, состоящем из аминокислот с положительными зарядами, присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Например, модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот из положительно заряженных аминокислот, таких как лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H), присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Модификацией может быть модификация одной или двух или более аминокислот, расположенных в участке, состоящем из не являющихся положительно заряженными аминокислот, присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Например, модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот из не являющихся положительно заряженными аминокислот, то есть аспарагиновой кислоты (D), глутаминовой кислоты (E), серина (S), треонина (T), аспарагина (N), глутамина (Q), цистеина (C), пролина (P), глицина (G), аланина (A), валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), метионина (M), фенилаланина (F), тирозина (Y) и триптофана (W), присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

В качестве другого примера модификация может представлять собой модификацию одной или двух

или более аминокислот из незаряженных аминокислот, то есть серина (S), треонина (T), аспарагина (N), глутамина (Q), цистеина (C), пролина (P), глицина (G), аланина (A), валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), метионина (M), фенилаланина (F), тирозина (Y) и триптофана (W), присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Кроме того, модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот, имеющих гидрофобные остатки, присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Например, модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот из глицина (G), аланина (A), валина (V), изолейцина (I), лейцина (L), метионина (M), фенилаланина (F), тирозина (Y) и триптофана (W), присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот, имеющих полярные остатки, присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Например, модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот из серина (S), треонина (T), аспарагина (N), глутамина (Q), цистеина (C), пролина (P), лизина (K), аргинина (R), гистидина (H), аспарагиновой кислоты (D) и глутаминовой кислоты (E), присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Кроме того, модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот, включающих лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H), присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Например, модификация может представлять собой замену одной или двух или более аминокислот, включающих лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H), присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот, включающих аспарагиновую кислоту (D) и глутаминовую кислоту (E), присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Например, модификация может представлять собой замену одной или двух или более аминокислот, включающих аспарагиновую кислоту (D) и глутаминовую кислоту (E), присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот, включающих серин (S), треонин (T), аспарагин (N), глутамин (Q), цистеин (C), пролин (P), глицин (G), аланин (A), валин (V), изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), фенилаланин (F), тирозин (Y) и триптофан (W), присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Например, модификация может представлять собой замену одной или двух или более аминокислот, включающих серин (S), треонин (T), аспарагин (N), глутамин (Q), цистеин (C), пролин (P), глицин (G), аланин (A), валин (V), изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), фенилаланин (F), тирозин (Y) и триптофан (W), присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Кроме того, модификация может представлять собой модификацию одной, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи или более аминокислот, присутствующих в существующем в природе ферменте CRISPR.

Кроме того, в мутантном ферменте CRISPR модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот, присутствующих в домене RuvC фермента CRISPR. В данном случае домен RuvC может представлять собой домен RuvCI, RuvCII или RuvCIII.

Модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот, присутствующих в домене HNH фермента CRISPR.

Модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот, присутствующих в домене REC фермента CRISPR.

Модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот, присутствующих в домене PI фермента CRISPR.

Модификация может представлять собой модификацию двух или более аминокислот, содержащихся по меньшей мере в двух или более доменах из доменов REC, RuvC, HNH и PI фермента CRISPR.

В одном примере модификация может представлять собой модификацию двух или более аминокислот, содержащихся в доменах REC и RuvC фермента CRISPR.

В одном иллюстративном варианте осуществления в мутантном SpCas9 модификация может представлять собой модификацию по меньшей мере двух или более из аминокислот A203, H277, G366, F539, I601, M763, D965 и F1038, содержащихся в доменах REC и RuvC из SpCas9.

В качестве другого примера модификация может представлять собой модификацию двух или более аминокислот, содержащихся в доменах REC и HNH фермента CRISPR.

В одном иллюстративном варианте осуществления в мутантном SpCas9 модификация может представлять собой модификацию по меньшей мере двух или более из аминокислот 203, H277, G366, F539, I601 и K890, содержащихся в доменах REC и HNH из SpCas9.

В одном примере модификация может представлять собой модификацию двух или более аминокислот, содержащихся в доменах REC и PI фермента CRISPR.

В одном иллюстративном варианте осуществления в мутантном SpCas9 модификация может представлять собой модификацию по меньшей мере двух или более из аминокислот 203, H277, G366, F539, I601, T1102 и D1127, содержащихся в доменах REC и PI из SpCas9.

В качестве другого примера модификация может представлять собой модификацию трех или более аминокислот, содержащихся в доменах REC, RuvC и HNH фермента CRISPR.

В одном иллюстративном варианте осуществления в мутантном SpCas9 модификация может представлять собой модификацию по меньшей мере трех или более из аминокислот A203, H277, G366, F539, I601, M763, K890, D965 и F1038, содержащихся в доменах REC, RuvC и HNH из SpCas9.

В одном примере модификация может представлять собой модификацию трех или более из аминокислот, содержащихся в доменах REC, RuvC и PI, содержащихся в ферменте CRISPR.

В одном иллюстративном варианте осуществления в мутантном SpCas9 модификация может представлять собой модификацию по меньшей мере трех или более из аминокислот A203, H277, G366, F539, I601, M763, D965, F1038, T1102 и D1127, содержащихся в доменах REC, RuvC и PI из SpCas9.

В качестве другого примера модификация может представлять собой модификацию трех или более аминокислот, содержащихся в доменах REC, HNH и PI фермента CRISPR.

В одном иллюстративном варианте осуществления в мутантном SpCas9 модификация может представлять собой модификацию по меньшей мере трех или более из аминокислот A203, H277, G366, F539, I601, K890, T1102 и D1127, содержащихся в доменах REC, HNH и PI из SpCas9.

В одном примере модификация может представлять собой модификацию трех или более аминокислот, содержащихся в доменах RuvC, HNH и PI фермента CRISPR.

В одном иллюстративном варианте осуществления в мутантном SpCas9 модификация может представлять собой модификацию по меньшей мере трех или более из аминокислот M763, K890, D965, F1038, T1102 и D1127, содержащихся в доменах RuvC, HNH и PI из SpCas9.

В качестве другого примера модификация может представлять собой модификацию четырех или более аминокислот, содержащихся в доменах REC, RuvC, HNH и PI фермента CRISPR.

В одном иллюстративном варианте осуществления в мутантном SpCas9 модификация может представлять собой модификацию по меньшей мере четырех или более из аминокислот A203, H277, G366, F539, I601, M763, K890, D965, F1038, T1102 и D1127, содержащихся в доменах REC, RuvC, HNH и PI из SpCas9.

Кроме того, в мутантном ферменте CRISPR модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более аминокислот, вовлеченных в нуклеазную активность фермента CRISPR.

Например, в мутантном SpCas9 модификация может представлять собой модификацию одной или двух или более групп, состоящих из аминокислот D10, E762, H840, N854, N863 и D986, или одной или двух или более групп, состоящих из аминокислот, соответствующих другим ортологам Cas9.

Модификация может представлять собой модификацию, предназначенную для частичной инактивации нуклеазной активности фермента CRISPR, и таким мутантным ферментом CRISPR может быть никаза.

В данном случае модификация может представлять собой модификацию, предназначенную для инактивации нуклеазной активности домена RuvC фермента CRISPR, и такой мутантный фермент CRISPR может не расщеплять не являющуюся комплементарной нить целевых гена или нуклеиновой кислоты, то есть нить которая не образует комплементарную связь с gRNA.

В одном иллюстративном варианте осуществления в случае SpCas9, если остаток 10 в аминокислотной последовательности SpCas9 подвергли мутации из аспарагиновой кислоты в аланин, то есть если имела место мутация в D10A, то нуклеазная активность домена RuvC инактивируется, и таким образом SpCas9 может быть использован в качестве никазы. Полученная таким образом никаза не способна расщеплять не являющуюся комплементарной нить целевых гена или нуклеиновой кислоты, то есть нить, которая не образует комплементарную связь с gRNA.

В другом иллюстративном варианте осуществления в случае CjCas9, если остаток 8 в аминокислотной последовательности CjCas9 подвергли мутации из аспарагиновой кислоты в аланин, то есть если имела место мутация в D8A, то нуклеазная активность домена RuvC инактивируется, и таким образом CjCas9 может быть использован в качестве никазы. Полученная таким образом никаза не способна расщеплять не являющуюся комплементарной нить целевых гена или нуклеиновой кислоты, то есть нить, которая не образует комплементарную связь с gRNA.

Кроме того, в данном случае модификация может представлять собой модификацию, предназначенную для инактивации нуклеазной активности домена HNH фермента CRISPR, и такой мутантный фермент CRISPR не способен расщеплять комплементарную нить целевых гена или нуклеиновой кислоты, то есть нить, образующую комплементарную связь с gRNA.

В одном иллюстративном варианте осуществления в случае SpCas9, если остаток 840 в аминокислотной последовательности SpCas9 подвергли мутации из гистидина в аланин, то есть если имела место мутация в H840A, то нуклеазная активность домена HNH инактивируется, и таким образом SpCas9 может быть использован в качестве никазы. Полученная таким образом никаза не способна расщеплять комплементарную нить целевых гена или нуклеиновой кислоты, то есть нить, которая образует компле-

ментарную связь с gRNA.

В другом иллюстративном варианте осуществления в случае CjCas9, если остаток 559 в аминокислотной последовательности CjCas9 подвергли мутации из гистидина в аланин, то есть если имела место мутация в H559A, то нуклеазная активность домена HNH инактивируется, и таким образом CjCas9 может быть использован в качестве никаза. Полученная таким образом никаза не способна расщеплять комплементарную нить целевых гена или нуклеиновой кислоты, то есть нить, которая образует комплементарную связь с gRNA.

Кроме того, модификация может представлять собой модификацию, предназначенную для полной инактивации нуклеазной активности фермента CRISPR, и такой мутантный фермент CRISPR может представлять собой неактивный фермент CRISPR.

В данном случае модификация может представлять собой модификацию, предназначенную для инактивации нуклеазных активностей доменов RuvC и HNH фермента CRISPR, и такой мутантный фермент CRISPR не может расщеплять двойную нить целевых гена или нуклеиновой кислоты.

В одном иллюстративном варианте осуществления в случае SpCas9, если остатки 10 и 840 в аминокислотной последовательности SpCas9 подвергли мутации из аспарагиновой кислоты и гистидина в аланин, то есть имела место мутация до D10A и H840A соответственно, нуклеазные активности домена RuvC и домена HNH инактивируются, а двойная нить целевых гена или нуклеиновой кислоты не может быть полностью расщеплена.

В другом иллюстративном варианте осуществления в случае CjCas9, если остатки 8 и 559 в аминокислотной последовательности CjCas9 подвергли мутации из аспарагиновой кислоты и гистидина в аланин, то есть имела место мутация до D8A и H559A соответственно, нуклеазные активности доменов RuvC и HNH инактивируются, и таким образом двойная нить целевых гена или нуклеиновой кислоты не может быть полностью расщеплена.

Кроме того, мутантный фермент CRISPR может дополнительно необязательно включать функциональный домен в дополнение к природным характеристикам фермента CRISPR, и такой мутантный фермент CRISPR может иметь дополнительную характеристику в дополнение к природным характеристикам.

В данном случае функциональный домен может представлять собой домен с метилазной активностью, деметилазной активностью, активностью активации транскрипции, активностью подавления транскрипции, активностью высвобождения фактора транскрипции, активностью модификации гистонов, активностью расщепления РНК или активностью связывания нуклеиновой кислоты, или метку или репортерный ген для выделения и очистки белка (в том числе пептида), при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

Функциональные домен, пептид, полипептид или белок могут представлять собой дезаминазу.

Например, неполный или частичный фермент CRISPR может дополнительно включать цитидиндезаминазу в качестве функционального домена. В одном иллюстративном варианте осуществления цитидиндезаминаза, например, редактирующий комплекс 1 аполипротеина В (APOBEC1) может быть добавлен к никазе SpCas9 с получением за счет этого слитого белка. Образованный таким образом комплекс [никаза SpCas9]-[APOBEC1] может быть использован в репарации оснований или редактировании С в Т или U или G в А.

Метка включает гистидиновую (His) метку, метку V5, метку FLAG, метку гемагглютинаина гриппа (HA), метку Мус, метку VSV-G и тиоредоксиновую (Тгх) метку, а репортерный ген включает глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT) β-галактозидазу, β-глюкоронидазу, люциферазу, аутофлуоресцентные белки, в том числе зеленый флуоресцентный белок (GFP), HcRed, DsRed, голубой флуоресцентный белок (CFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) и синий флуоресцентный белок (BFP), при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

Кроме того, функциональный домен может представлять собой последовательность или сигнал ядерной локализации (NLS) или последовательность или сигнал ядерного экспорта (NES).

В одном примере фермент CRISPR может включать один или более NLS. В данном случае один или более NLS могут быть включены в N-конец фермента CRISPR или рядом с ним; C-конец фермента или рядом с ним или в их сочетании. NLS может представлять собой последовательность NLS, полученную из следующих NLS, но при этом настоящее изобретение не ограничивается ими:

NLS большого Т-антигена вируса SV40 с аминокислотной последовательностью PKKKRKV (SEQ ID NO: 55);

NLS из нуклеоплазмина (например, двучастичный NLS нуклеоплазмина с последовательностью KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 56));

c-мус NLS с аминокислотной последовательностью PAAKRVKLD (SEQ ID NO: 57) или RQRRNELKRSP (SEQ ID NO: 58);

hRNPA1 M9 NLS с последовательностью NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY (SEQ ID NO: 59);

последовательность RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV (SEQ ID NO: 60) полученного из импортина- α домена IBB;
 последовательности VSRKRPRP (SEQ ID NO: 61) и PPKKARED (SEQ ID NO: 62) Т-белка миомы;
 последовательность PQPKKKPL (SEQ ID NO: 63) р53 человека; последовательность SALIKKKKKMAP (SEQ ID NO: 64) c-abl IV мыши;
 последовательности DRLRR (SEQ ID NO: 65) и PKQKKRK (SEQ ID NO: 66) вируса гриппа NS1;
 последовательность RKLKKKIKKL (SEQ ID NO: 67) антигена вируса-дельта гепатита;
 последовательность REKKKFLKRR (SEQ ID NO: 68) белка Mx1 мыши;
 последовательность KRKGDEVGDGVDEVAKKKSKK (SEQ ID NO: 69) поли (АДФ-рибоза)-полимеразы человека или NLS с последовательностью RKCLQAGMNLEARKTKK (SEQ ID NO: 70), полученной из последовательности рецептора стероидного гормона глюкокортикоида (человека).

Кроме того, мутантный фермент CRISPR может включать фермент CRISPR разделенного типа, полученный путем деления фермента CRISPR на две или более части. Термин "разделенный" относится к функциональному или структурному делению белка или произвольному делению белка на две или более части.

В данном случае фермент CRISPR разделенного типа может быть полностью, не полностью или частично активным ферментом или неактивным ферментом.

Например, SpCas9 может быть разделен на две части между остатком 656, тирозином, и остатком 657, треонином, за счет чего образуется разделенный SpCas9.

Кроме того, фермент CRISPR разделенного типа может избирательно содержать дополнительный домен, пептид, полипептид или белок для восстановления.

В данном случае "восстановление" относится к образованию фермента CRISPR разделенного типа который должен быть структурно таким же или подобным ферменту CRISPR дикого типа.

Дополнительным доменом, пептидом, полипептидом или белком для восстановления могут быть домены димеризации FRB и FKBP; интеин; домены ERT и VPR или домены, которые образуют гетеродимер при определенных условиях.

Например, SpCas9 может быть разделен на две части между остатком 713, серином, и остатком 714, глицином, за счет чего образуется разделенный SpCas9. Домен FRB может быть соединен с одной из двух частей, а домен FKBP может быть соединен с другой. В полученном таким образом разделенном SpCas9 домен FKBP и домен FKBP могут быть составлены в димер в среде, в которой присутствует рапамицин, за счет чего получают восстановленный фермент CRISPR.

Фермент CRISPR или мутантный фермент CRISPR, описанный в настоящем изобретении, может представлять собой полипептид, белок или нуклеиновую кислоту, имеющие кодирующую их последовательность, и может быть кодон-оптимизирован в отношении субъекта для введения фермента CRISPR или мутантного фермента CRISPR.

Термин "кодон-оптимизация" относится к процессу модификации последовательности нуклеиновой кислоты путем сохранения нативной аминокислотной последовательности при замене по меньшей мере одного кодона нативной последовательности кодоном, который чаще или наиболее часто используется в клетках-хозяевах, чтобы улучшить экспрессию в клетках-хозяевах. Разные виды имеют специфическое предпочтение в отношении определенного кодона конкретной аминокислоты, и предпочтение в кодонах (различия в использовании кодонов между организмами) часто коррелирует с эффективностью трансляции мРНК, которая считается зависимой от характеристики транслированного кодона и доступности специфической молекулы тРНК. Преобладание тРНК, выбранной в клетках, как правило, отражает кодоны, наиболее часто используемые в синтезе пептидов. Следовательно, ген может быть изменен путем оптимальной экспрессии гена в данном организме на основе оптимизации кодонов.

3. Целевая последовательность.

Термин "целевая последовательность" представляет собой последовательность оснований, присутствующую в целевых гене или нуклеиновой кислоте и обладающую комплементарностью с направляющей последовательности, содержащейся в направляющем домене направляющей нуклеиновой кислоты. Целевая последовательность представляет собой последовательность оснований, которая может варьироваться в соответствии с целевыми геном или нуклеиновой кислотой, то есть субъект для манипуляции с геном или его коррекции, который может быть сконструирован в различных формах в соответствии с целевыми геном или нуклеиновой кислотой.

Целевая последовательность может образовывать комплементарную связь с направляющей последовательностью, содержащейся в направляющем домене направляющей нуклеиновой кислоты, и при этом длина целевой последовательности может быть такой же, как у направляющей последовательности.

Целевая последовательность может представлять собой последовательность из 5-50 оснований.

В одном варианте осуществления целевая последовательность может представлять собой последовательность из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 оснований.

Целевая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты,

комплементарная направляющей последовательности, содержащейся в направляющем домене направляющей нуклеиновой кислоты, которая характеризуется, например, по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%, или большей комплементарностью или полной комплементарностью.

В одном примере целевая последовательность может представлять собой или включать последовательность из 1-8 оснований, которая не является комплементарной направляющей последовательности, содержащейся в направляющем домене направляющей нуклеиновой кислоты.

Кроме того, целевая последовательность может представлять собой последовательность оснований, смежная с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая может распознаваться редактирующим белком.

В одном примере целевая последовательность может представлять собой непрерывную последовательность из 5-50 оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, которая может распознаваться редактирующим белком.

В одном иллюстративном варианте осуществления целевые последовательности для комплекса gRNA-фермент CRISPR будут описаны ниже.

Если на целевые ген или нуклеиновую кислоту нацеливается комплекс gRNA-фермент CRISPR, то целевая последовательность обладает комплементарностью с направляющей последовательностью, содержащейся в направляющем домене gRNA. Целевая последовательность представляет собой последовательность оснований, которая варьируется в соответствии с целевыми геном или нуклеиновой кислотой, то есть субъект для манипуляции с геном или его коррекции, который может быть сконструирован в различных формах в соответствии с целевыми геном или нуклеиновой кислотой.

Кроме того, целевая последовательность может представлять собой последовательность оснований, смежная с последовательностью PAM, которая может распознаваться ферментом CRISPR, то есть Cas9 или Cpf1.

В одном примере целевая последовательность может представлять собой непрерывную последовательность из 5-50 оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности PAM, которая распознается ферментом CRISPR.

В одном иллюстративном варианте осуществления, если фермент CRISPR представляет собой SpCas9, то целевая последовательность может представлять собой непрерывную последовательность из 16-25 оснований, смежную с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NGG-3', 5'-NAG-3' и/или 5'-NGA-3' (N=A, T, G или C; или A, U, G или C).

В другом иллюстративном варианте осуществления, если фермент CRISPR представляет собой StCas9, то целевая последовательность может быть непрерывной последовательностью из 16-25 оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NGGNG-3' и/или 5'-NNAGAAW-3' (W=A или T, и N=A, T, G или C; или A, U, G или C).

В следующем иллюстративном варианте осуществления, если фермент CRISPR представляет собой NmCas9, то целевая последовательность может представлять собой непрерывную последовательность из 16-25 оснований, смежную с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNNGATT-3' и/или 5'-NNNGCTT-3' (N=A, T, G или C; или A, U, G или C).

В одном иллюстративном варианте осуществления, если фермент CRISPR представляет собой CjCas9, то целевая последовательность может представлять собой непрерывную последовательность из 16-25 оснований, смежную с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNNVRYAC-3' (V=G, C или A; R=A или G, Y=C или T, N=A, T, G или C; или A, U, G или C).

В другом иллюстративном варианте осуществления, если фермент CRISPR представляет собой SmCas9, то целевая последовательность может представлять собой непрерывную последовательность из 16-25 оснований, смежную с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NGG-3' и/или 5'-NAAR-3' (R=A или G, N=A, T, G или C; или A, U, G или C).

В еще одном иллюстративном варианте осуществления, если фермент CRISPR представляет собой SaCas9, то целевая последовательность может представлять собой непрерывную последовательность из 16-25 оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNGRR-3', 5'-NNGRRT-3' и/или 5'-NNGRRV-3' (R=A или G, V=G, C или A, N=A, T, G или C; или A, U, G или C).

В одном иллюстративном варианте осуществления, если фермент CRISPR представляет собой Cpf1, целевая последовательность может представлять собой непрерывную последовательность из 16-25 оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-TTN-3' (N=A, T, G или C; или A, U, G или C).

В одном иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению целевая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, содержащуюся в одном или более генах, выбранных из группы, состоящей из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8.

Целевая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, содержащуюся в гене FAD2.

экзона, интрона или их комбинации гена FAD6.

Целевая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты экзона, интрона или их комбинации гена FAD7.

Целевая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты экзона, интрона или их комбинации гена FAD8.

В качестве альтернативы целевая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, включающая подвергнутый мутации участок или смежная с ним (например, участок, отличный от участка гена дикого типа) одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8.

Целевая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, включающую мутантный участок гена FAD2 или смежную с ним.

Целевая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, включающую мутантный участок гена FAD3 или смежную с ним.

Целевая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, включающую мутантный участок гена FAD6 или смежную с ним.

Целевая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, включающую мутантный участок гена FAD7 или смежную с ним.

Целевая последовательность может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, включающую мутантный участок гена FAD8 или смежную с ним.

В качестве альтернативы целевая последовательность может представлять собой непрерывную последовательность нуклеиновой кислоты из 5-50 оснований одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8.

Целевая последовательность может представлять собой непрерывную последовательность нуклеиновой кислоты из 5-50 оснований гена FAD2.

Целевая последовательность может представлять собой непрерывную последовательность нуклеиновой кислоты из 5-50 оснований гена FAD3.

Целевая последовательность может представлять собой непрерывную последовательность нуклеиновой кислоты из 5-50 оснований гена FAD6.

Целевая последовательность может представлять собой непрерывную последовательность нуклеиновой кислоты из 5-50 оснований гена FAD7.

Целевая последовательность может представлять собой непрерывную последовательность нуклеиновой кислоты из 5-50 оснований гена FAD8.

В одном иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению вышеупомянутые целевые последовательности гена FAD2 кратко описаны в табл. 1.

Продукт ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, подвергнутого манипуляции.

4. Комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок и его применение.

Комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может модифицировать мишень.

Например, комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может быть использован для максимального регулирования (например, ингибирования, подавления, снижения, повышения или стимуляции) экспрессии представляющего интерес белка, удаления белка, регулирования (например, ингибирования, подавления, снижения, повышения или стимуляции) активности белка или экспрессии нового белка.

В данном случае комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может действовать на уровне ДНК, РНК, гена или хромосомы.

Например, комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может регулировать (например, ингибировать, подавлять, снижать, повышать или стимулировать) экспрессию белка, кодируемого целевой ДНК, удалять белок, регулировать (например, ингибировать, подавлять, снижать, повышать или стимулировать) активность белка или экспрессировать модифицированный белок посредством манипуляции или модификации целевой ДНК.

В другом примере комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может регулировать (например, ингибировать, подавлять, снижать, повышать или стимулировать) экспрессию белка, кодируемого целевой ДНК, удалять белок, регулировать (например, ингибировать, подавлять, снижать, повышать или стимулировать) активность белка или экспрессировать модифицированный белок посредством манипуляции с или модификации целевой РНК.

В одном примере комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может регулировать (например, ингибировать, подавлять, снижать, повышать или стимулировать) экспрессию белка, кодируемого целевой ДНК, удалять белок, регулировать (например, ингибировать, подавлять, снижать, повышать или стимулировать) активность белка или экспрессировать модифицированный белок посредством манипуляции или модификации целевого гена.

В качестве другого примера, комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок

может регулировать (например, ингибировать, подавлять, снижать, повышать или стимулировать) экспрессию белка, кодируемого целевой ДНК, удалять белок, регулировать (например, ингибировать, подавлять, снижать, повышать или стимулировать) активность белка или экспрессировать модифицированный белок посредством манипуляции или модификации целевой хромосомы.

Комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может действовать на стадиях транскрипции и трансляции гена.

В одном примере комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может стимулировать или подавлять транскрипцию целевого гена, за счет чего осуществляется регуляция (например, ингибирование, подавление, снижение, повышение или стимуляция) экспрессии белка, кодируемого целевым геном.

В другом примере комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может стимулировать или подавлять трансляцию целевого гена, за счет чего осуществляется регуляция (например, ингибирование, подавление, снижение, повышение или стимуляция) экспрессии белка, кодируемого целевым геном.

Комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может действовать на уровне белка.

В одном примере комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может осуществлять манипуляцию с целевым белком или модифицировать его, за счет чего происходит удаление целевого белка или регуляция (например, ингибирование, подавление, снижение, повышение или стимуляция) активности белка.

В одном иллюстративном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок, используемый для манипуляции с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором, например, с геном FAD, предпочтительно геном FAD2, геном FAD3, геном FAD6, геном FAD7 и/или геном FAD8. Предпочтительно представлен комплекс gRNA-фермент CRISPR.

В частности, в настоящем изобретении может быть представлена gRNA, включающая направляющий домен, способный образовывать комплементарную связь с целевой последовательностью из гена, например, выделенная или не являющаяся природной gRNA и кодирующая ее ДНК. gRNA и кодирующая ее последовательность ДНК могут быть сконструированы с возможностью комплементарного связывания с целевой последовательностью, приведенной в табл. 1.

Кроме того, целевой участок gRNA сконструирован с обеспечением третьего гена, который имеет модификацию нуклеиновой кислоты, например, разрывы двойной или одинарной нити; или специфической функции в целевом сайте в гене FAD2, гене FAD3, гене FAD6, гене FAD7 и/или гене FAD8.

Кроме того, при использовании двух или более gRNA для индуцирования двух или более явлений расщепления в целевой гене, например, разрыва двойной или одинарной нити, могут происходить два или более явлений расщепления из-за одинаковых или разных белков Cas9.

gRNA может нацеливаться, например, на два или более из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и/или гена FAD8, или на два или более участков в каждом из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и/или гена FAD8, и может независимо индуцировать расщепление двойной нити и/или одинарной нити гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и/или гена FAD8, или может индуцировать вставку одного чужеродного нуклеотида в сайт расщепления гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и/или гена FAD8.

Кроме того, в другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота, из которой состоит комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок, может включать:

(a) последовательность, кодирующую направляющую нуклеиновую кислоту, включающую направляющий домен, который является комплементарным целевой последовательности гена FAD2, как описано в настоящем документе; и

(b) последовательность, кодирующую редактирующий белок.

В данном случае могут присутствовать две или более из (a) в соответствии с целевым участком, и в (b) могут использоваться одинаковые или два или более редактирующих белков.

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота может быть сконструирована для нацеливания на ферментативно неактивный редактирующий белок или его слитый белок (например, слитый домен-репрессор транскрипции) для его размещения достаточно близко к целевому сайту нокдауна, чтобы уменьшить, снизить или ингибировать экспрессию гена FAD2.

Кроме того, должно быть очевидно, что вышеописанные структура, функция и все варианты применения комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок будут использованы в манипуляции с геном FAD2, геном FAD3, геном FAD6, геном FAD7 и/или геном FAD8.

Применение комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

В одном варианте осуществления для применения комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок в соответствии с настоящим изобретением ниже будет описана манипуляция с целевой ДНК, РНК, генами или хромосомами или их модификация с использованием комплекса gRNA -

фермент CRISPR.

Манипуляция с геном.

С целевым геном или нуклеиновой кислотой можно осуществлять манипуляцию или корректировать их с использованием вышеописанного комплекса gRNA-фермент CRISPR, то есть комплекса CRISPR. В данном случае манипуляция с целевыми геном или нуклеиновой кислотой или их корректирование включает стадии из i) расщепления или повреждения целевых гена или нуклеиновой кислоты и ii) репарация поврежденных целевых гена или нуклеиновой кислоты.

i) Расщепление или повреждение целевых гена или нуклеиновой кислоты.

i) Расщепление или повреждение целевых гена или нуклеиновой кислоты может представлять собой расщепление или повреждение целевых гена или нуклеиновой кислоты с использованием комплекса CRISPR и, в частности, расщепление или повреждение целевой последовательности в целевых гене или нуклеиновой кислоте.

В одном примере расщепление или повреждение целевых гена или нуклеиновой кислоты с использованием комплекса CRISPR может представлять собой полное расщепление или повреждение двойной нити целевой последовательности.

В одном иллюстративном варианте осуществления при использовании SpCas9 дикого типа двойная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с gRNA, может быть полностью расщеплена.

В другом иллюстративном варианте осуществления при использовании никазы SpCas9 (D10A) и никазы SpCas9 (H840A) комплементарная одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (D10A), а не являющаяся комплементарной одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (H840A), и при этом расщепления могут происходить последовательно или одновременно.

В следующем иллюстративном варианте осуществления при использовании никазы SpCas9 (D10A), никазы SpCas9 (H840A) и двух gRNA, имеющих разные целевые последовательности, комплементарная одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с первой gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (D10A), не являющаяся комплементарной одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь со второй gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (H840A), и при этом расщепления могут происходить последовательно или одновременно.

В качестве другого примера расщепление или повреждение целевых гена или нуклеиновой кислоты с использованием комплекса CRISPR может представлять собой расщепление или повреждение только одинарной нити целевой последовательности. В данном случае одинарная нить может представлять собой комплементарную одинарную нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с gRNA, или не являющуюся комплементарной одинарную нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с gRNA.

В одном иллюстративном варианте осуществления при использовании никазы SpCas9 (D10A) комплементарная одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (D10A), но не являющаяся комплементарной одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с gRNA, не может быть расщеплена.

В другом иллюстративном варианте осуществления при использовании никазы SpCas9 (H840A) комплементарная одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (H840A), но не являющаяся комплементарной одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с gRNA, не может быть расщеплена.

В качестве другого примера расщепление или повреждение целевых гена или нуклеиновой кислоты с использованием комплекса CRISPR может представлять собой частичное удаление фрагмента нуклеиновой кислоты.

В одном иллюстративном варианте осуществления при использовании двух gRNA, имеющих разные целевые последовательности, и SpCas9 дикого типа двойная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с первой gRNA, может быть расщеплена, и двойная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь со второй gRNA, может быть расщеплена, что приводит к удалению фрагментов нуклеиновой кислоты за счет первой и второй gRNA и SpCas9.

В другом иллюстративном варианте осуществления при использовании двух gRNA, имеющих разные целевые последовательности, SpCas9 дикого типа, никазы SpCas9 (D10A) и никазы SpCas9 (H840A) двойная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с первой gRNA, может быть расщеплена SpCas9 дикого типа, комплементарная одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь со второй gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (D10A), а не являющаяся комплементарной одинарная нить может быть расщеплена никазой SpCas9 (H840A), что приводит к удалению фрагментов нуклеиновой кислоты с помощью первой и второй gRNA, SpCas9 дикого типа, никазой SpCas9 (D10A) и никазой SpCas9 (H840A).

В следующем иллюстративном варианте осуществления при использовании двух gRNA, имеющих разные целевые последовательности, никазы SpCas9 (D10A) и никазы SpCas9 (H840A) комплементарная одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с первой gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (D10A), не являющаяся комплементарной одинарная нить может быть расщеплена никазой SpCas9 (H840A), комплементарная двойная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь со второй gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (D10A), а не являющаяся комплементарной одинарная нить может быть расщеплена никазой SpCas9 (H840A), что приводит к удалению фрагментов нуклеиновой кислоты с помощью первой и второй gRNA, никазой SpCas9 (D10A) и никазой SpCas9 (H840A).

В еще одном иллюстративном варианте осуществления при использовании трех gRNA, имеющих разные целевые последовательности, SpCas9 дикого типа, никазы SpCas9 (D10A) и никазы SpCas9 (H840A) двойная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с первой gRNA, может быть расщеплена SpCas9 дикого типа, комплементарная одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь со второй gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (D10A), а не являющаяся комплементарной одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с третьей gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (H840A), что приводит к удалению фрагментов нуклеиновой кислоты с помощью первой gRNA, второй gRNA, третьей gRNA, SpCas9 дикого типа, никазой SpCas9 (D10A) и никазой SpCas9 (H840A).

В еще одном иллюстративном варианте осуществления при использовании четырех gRNA, имеющих разные целевые последовательности, никазы SpCas9 (D10A) и никазы SpCas9 (H840A) комплементарная одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с первой gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (D10A), не являющаяся комплементарной одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь со второй gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (H840A), комплементарная одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с третьей gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (D10A), а не являющаяся комплементарной одинарная нить целевой последовательности, образующей комплементарную связь с четвертой gRNA, может быть расщеплена никазой SpCas9 (H840A), что приводит к удалению фрагментов нуклеиновой кислоты с помощью первой gRNA, второй gRNA, третьей gRNA, четвертой gRNA, никазой SpCas9 (D10A) и никазой SpCas9 (H840A).

ii) Репарация или восстановление поврежденных целевых гена или нуклеиновой кислоты.

Целевые ген или нуклеиновая кислота, расщепленные или поврежденные комплексом CRISPR, могут быть репарированы или восстановлены с помощью негомولوجичного соединения концов (NHEJ) и направляемой гомологией репарации (HDR).

Негомولوجичное соединение концов (NHEJ).

NHEJ представляет собой способ восстановления или репарации двухнитевых разрывов в ДНК путем соединения вместе обоих концов расщепленной двойной или одинарной нити, и, как правило, если два совместимых конца, образованных за счет разрыва двойной нити (например, при расщеплении), часто контактируют друг с другом для полного соединения двух концов, то разорванная двойная нить восстанавливается. NHEJ представляет собой способ восстановления, который может быть использован на протяжении всего клеточного цикла, но обычно осуществляется, когда отсутствует гомологичный геном, который можно использовать в качестве матрицы в клетках, например, в фазе G1.

В процессе репарация поврежденных гена или нуклеиновой кислоты с использованием NHEJ некоторые вставки и/или делеции (инсерционно-делеционные мутации) в последовательности нуклеиновой кислоты осуществляются в репарированном с помощью NHEJ участке, при этом такие вставки и/или делеции вызывают сдвиг лидирующей рамки, что дает мРНК транскрипта со сдвигом рамки. В результате утрачиваются природные функции из-за нонсенс-опосредованной деградации или невозможности синтеза нормальных белков. Кроме того, хотя лидирующая рамка сохраняется, мутации, в которых вставка или делеция в значительном количестве в последовательности может быть обеспечена с целью нарушения функциональности белков. Мутация является зависимой от локуса, потому что мутация в значительном функциональном домене, вероятно, менее переносима, чем мутации в незначимом участке белка.

Хотя нельзя рассчитывать на инсерционно-делеционные мутации, полученные с помощью NHEJ, в природном состоянии, специфическая последовательность с инсерционно-делеционной мутацией является предпочтительной в данном участке с нарушением и может происходить из небольшого участка микрогомологии. Обычно длина делеции варьирует от 1 п.о. до 50 п.о., вставки имеют тенденцию к укорочению и часто включают короткую последовательность повторов, непосредственно окружающую участок с нарушением.

Кроме того, NHEJ представляет собой процесс, вызывающий мутацию, и если отсутствует необходимость в создании специфическую итоговой последовательности, его можно использовать для удаления мотива небольшой последовательности.

С использованием такого NHEJ может быть выполнен специфический нокаут гена, на который нацеливается комплекс CRISPR. Двойную нить или две одинарные нити целевых гена или нуклеиновой

кислоты могут быть расщеплены с использованием фермента CRISPR, такого как Cas9 или Cpf1, и двойная нить или две одинарные нити целевых гена или нуклеиновой кислоты с нарушением могут иметь инсерционно-делеционные мутации за счет NHEJ, за счет чего индуцируется специфический нокаут целевых гена или нуклеиновой кислоты. В данном случае сайт целевых гена или нуклеиновой кислоты, расщепленных ферментом CRISPR, может представлять собой не являющийся кодирующим или кодирующий участок, и, кроме того, сайт целевых гена или нуклеиновой кислоты, восстановленных с помощью NHEJ, может представлять собой не являющийся кодирующим или кодирующий участок.

Направляемая гомологией репарация (HDR).

HDR представляет собой способ коррекции без внесения ошибок, в котором используется гомологичная последовательность в качестве матрицы для репарации или восстановления поврежденных гена или нуклеиновой кислоты и, как правило, для репарации или восстановления нарушенной ДНК, то есть для восстановления наследственной информации клеток, при этом нарушенная ДНК репарируется с использованием информации с комплементарной последовательности оснований, которая не модифицирована, или информации с сестринской хроматиды. Наиболее распространенным типом HDR является гомологичная рекомбинация (HR). HDR представляет собой способ репарации или восстановления, обычно происходящий в фазе S или G2/M активно делящихся клеток.

Для репарации или восстановления поврежденной ДНК с использованием HDR вместо использования комплементарной последовательности оснований или сестринского хроматина клеток, ДНК-матрицу, искусственно синтезированную с использованием информации с комплементарной последовательности оснований или гомологичной последовательности оснований, то есть матрицу нуклеиновой кислоты, включающую комплементарную последовательность оснований или гомологичную последовательность оснований, можно обеспечивать в клетках с репарацией тем самым нарушенной ДНК. В данном случае при дальнейшем добавлении последовательности нуклеиновой кислоты или фрагмента нуклеиновой кислоты в матрицу нуклеиновой кислоты, предназначенную для репарации нарушенной ДНК, последовательность нуклеиновой кислоты или фрагмент нуклеиновой кислоты, дополнительно добавленные в нарушенную ДНК, могут быть подвергнуты нокину. Дополнительно добавленными последовательностью нуклеиновой кислоты или фрагментом нуклеиновой кислоты могут быть последовательность нуклеиновой кислоты или фрагмент нуклеиновой кислоты, предназначенные для коррекции целевых гена или нуклеиновой кислоты, модифицированных с помощью мутации до нормальных гена или нуклеиновой кислоты или гена, или нуклеиновой кислоты, подлежащих экспрессии в клетках, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

В одном примере двойная или одинарная нить целевых гена или нуклеиновой кислоты может быть расщеплена с использованием комплекса CRISPR, при этом в клетках может быть обеспечена матрица в виде нуклеиновой кислоты, включающая последовательность оснований, комплементарная последовательности оснований, смежной с сайтом расщепления, и при этом расщепленная последовательность оснований целевых гена или нуклеиновой кислоты может быть репарирована или восстановлена посредством HDR.

В данном случае матрица нуклеиновой кислоты, включающая комплементарную последовательность оснований, может иметь нарушенную ДНК, то есть расщепленную двойную или одинарную нить комплементарной последовательности оснований, и дополнительно включать последовательность нуклеиновой кислоты или фрагмент нуклеиновой кислоты, подлежащий вставке в нарушенную ДНК. Дополнительные последовательность нуклеиновой кислоты или фрагмент нуклеиновой кислоты могут быть вставлены в расщепленный сайт нарушенной ДНК, то есть в целевые ген или нуклеиновую кислоту, с использованием матрицы в виде нуклеиновой кислоты, включающей последовательность нуклеиновой кислоты или фрагмент нуклеиновой кислоты, подлежащие вставке в комплементарную последовательность оснований. В данном случае последовательность нуклеиновой кислоты или фрагмент нуклеиновой кислоты, подлежащие вставке, и дополнительные последовательность нуклеиновой кислоты или фрагмент нуклеиновой кислоты могут представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты или фрагмент нуклеиновой кислоты, предназначенные для коррекции целевых гена или нуклеиновой кислоты, модифицированных с помощью мутации до нормальных гена или нуклеиновой кислоты, или гена или нуклеиновой кислоты, подлежащих экспрессии в клетках. Комплементарная последовательность оснований может представлять собой последовательность оснований, имеющую комплементарные связи с нарушенной ДНК, то есть с правой и левой последовательностями оснований расщепленной двойной или одинарной нити целевых гена или нуклеиновой кислоты. В качестве альтернативы комплементарная последовательность оснований может представлять собой последовательность оснований, имеющую комплементарные связи с нарушенной ДНК, то есть 3'- и 5'-концы расщепленной двойной или одинарной нити целевых гена или нуклеиновой кислоты. Комплементарная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 15-3000 оснований, при этом длина или размер комплементарной последовательности оснований могут быть подходящим образом сконструированы в соответствии с размером матрицы в виде нуклеиновой кислоты или целевого гена. В данном случае в качестве матрицы в виде нуклеиновой кислоты может быть использована двух- или односторонняя нуклеиновая кислота, или она может быть линейной или кольцевой, при этом настоящее изобретение не ограничивается

ими.

В качестве другого примера двух- или одностранные целевые ген или нуклеиновая кислота расщепляются с использованием комплекса CRISPR, при этом в клетках может быть обеспечена матрица в виде нуклеиновой кислоты, включающая гомологичную последовательность оснований с последовательностью оснований, смежной с сайтом расщепления, и при этом расщепленная последовательность оснований целевого гена или нуклеиновой кислоты может быть репарирована или восстановлена посредством HDR.

В данном случае матрица нуклеиновой кислоты, включающая гомологичную последовательность оснований, может представлять собой нарушенную ДНК, то есть расщепленную двух- или одностранный гомологичную последовательность оснований, и дополнительно включает последовательность нуклеиновой кислоты или фрагмент нуклеиновой кислоты, подлежащие вставке в нарушенную ДНК. Дополнительные последовательности нуклеиновой кислоты или фрагмент нуклеиновой кислоты могут быть вставлены в нарушенную ДНК, то есть расщепленный сайт целевого гена или нуклеиновой кислоты, с использованием матрицы нуклеиновой кислоты, включающей гомологичную последовательность оснований и последовательности нуклеиновой кислоты или фрагмент нуклеиновой кислоты, подлежащие вставке. В данном случае последовательность нуклеиновой кислоты или фрагмент нуклеиновой кислоты, подлежащие вставке, и дополнительные последовательности нуклеиновой кислоты или фрагмент нуклеиновой кислоты могут представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты или фрагмент нуклеиновой кислоты, предназначенные для коррекции целевого гена или нуклеиновой кислоты, модифицированных с помощью мутации до нормального гена или нуклеиновой кислоты, или гена или нуклеиновой кислоты, подлежащих экспрессии в клетках. Гомологичная последовательность оснований может представлять собой нарушенную ДНК, то есть последовательность оснований, обладающую гомологией с расщепленной двухстронной последовательностью оснований или правой и левой одностранными последовательностями оснований целевого гена или нуклеиновой кислоты. В качестве альтернативы комплементарная последовательность оснований может представлять собой последовательность оснований, обладающую гомологией с нарушенной ДНК, то есть с 3'- и 5'-концами расщепленной двойной или одинарной нити целевого гена или нуклеиновой кислоты. Гомологичная последовательность оснований может представлять собой последовательность из 15-3000 оснований, а длина или размер гомологичной последовательности оснований могут быть подходящим образом сконструированы в соответствии с размером матрицы в виде нуклеиновой кислоты или целевого гена или нуклеиновой кислоты. В данном случае в качестве матрицы в виде нуклеиновой кислоты может быть использована двух- или одностранный нуклеиновая кислота, которая может быть линейной или кольцевой, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

Помимо NHEJ и HDR, существуют способы репарации или восстановления нарушенной ДНК.

Одностранный гибридизация (SSA).

SSA представляет собой способ репарации разрывов двойной нити между двумя последовательностями повторов, присутствующими в целевой нуклеиновой кислоте, и, как правило, используется последовательность повторов из более 30 оснований. Последовательность повторов расщепляется (с наличием липких концов) с тем, чтобы получить одинарную нить по отношению к двойной нити целевой нуклеиновой кислоты на каждом из нарушенных концов, и после расщепления одностранный выступающий конец, содержащий последовательность повторов, покрывается белком RPA, за счет чего предотвращается неправильная гибридизация последовательностей повторов друг с другом. RAD52 связывается с каждой последовательностью повторов на выступающем конце и устанавливается последовательность, способная к гибридизации с комплементарной последовательностью повторов. После гибридизации одностранный свисающий участок выступающего конца расщепляется, и в ходе синтеза новой ДНК происходит заполнение определенного пропуска для восстановления двойной нити ДНК. В результате этой репарации последовательность ДНК между двумя повторами удаляется, и при этом длина делеции может зависеть от различных факторов, в том числе от расположения двух повторов, используемых в настоящем документе, и от пути или степени прохождения расщепления.

При SSA, аналогично HDR, используется комплементарная последовательность, то есть комплементарная последовательность повторов, но для сравнения при этом не требуется матрица в виде нуклеиновой кислоты, предназначенная для модификации или коррекции целевой последовательности нуклеиновой кислоты.

Репарация одностранный разрыва (SSBA).

Разрывы одинарной нити в геноме репарируются посредством отдельного механизма, SSBR, из вышеописанных механизмов репарации. В случае одностранный разрывов ДНК PARP1 и/или PARP2 распознает разрывы и вовлекает механизм репарации. Связывание PARP1 и активность в отношении разрывов ДНК являются временными, и при этом SSBR стимулируется путем поддержания стабильности белкового комплекса SSBR в поврежденных участках. Наиболее важным белком в комплексе SSBR является XRCC1, который взаимодействует с белком, активируя 3'- и 5'-концевой процессинг ДНК для стабилизации ДНК. Концевой процессинг, как правило, вовлекается в репарацию поврежденного 3'-конца до гидроксигированного состояния и/или поврежденного 5'-конца до фосфатного фрагмента, и после процес-

сирования концов происходит заполнение пропуска ДНК. Существуют два способа заполнения пропуска ДНК, то есть репарация короткими последовательностями и репарация длинными последовательностями, и при этом репарация короткими последовательностями включает вставку одного основания. После заполнения пропуска ДНК соединение концов обеспечивает ДНК-лигаза.

Репарация ошибочного спаривания (MMR).

MMR работает с ошибочно спаренными основаниями ДНК. Каждый из комплекса MSH2/6 или MSH2/3 обладает АТФазной активностью и таким образом играет важную роль в распознавании ошибочного спаривания и инициации репарации, и при этом MSH2/6 в основном распознает ошибочные спаривания основание-основание и идентифицирует ошибочные спаривания одного или двух оснований, а MSH2/3 в основном распознает более крупное ошибочное спаривание.

Экцизионная репарация оснований (BER).

BER представляет собой способ репарации, который активен на протяжении всего клеточного цикла и используется для удаления небольшого не нарушающего спираль поврежденного участка оснований из генома. Из поврежденной ДНК поврежденные основания удаляются путем расщепления N-гликозидной связи, соединяющей основание с фосфат-дезоксирибозным каркасом, а затем фосфодиэфирный каркас расщепляется, за счет чего образуется разрыв в одонитевой ДНК. Образованные таким образом нарушенные концы одинарной нити удаляются, пропуск, образовавшийся из-за удаленной одинарной нити, заполняется новым комплементарным основанием, а затем конец вновь заполненного комплементарного основания лигируется с каркасом с помощью ДНК-лигазы, что приводит к репарации поврежденной ДНК.

Экцизионная репарация нуклеотидов (NER)

NER представляет собой экцизионный механизм, играющий важную роль в удалении большого нарушающего спираль повреждения из ДНК, при этом в ходе распознавания повреждения удаляется короткий одонитевый сегмент ДНК, содержащий поврежденный участок, что дает одонитевой пропуск из 22-30 оснований. Полученный пропуск заполняется новым комплементарным основанием, и конец вновь заполненного комплементарного основания лигируется с каркасом с помощью ДНК-лигазы, за счет чего происходит репарация поврежденной ДНК.

Эффекты генной манипуляции.

Манипуляция с целевыми геном или нуклеиновой кислотой или их коррекция могут в значительной степени привести к эффектам в виде нокаута, нокадауна и нокина.

Нокаут.

Термин "нокаут" относится к инактивации целевого гена или нуклеиновой кислоты, а термин "инактивация целевого гена или нуклеиновой кислоты" относится к состоянию, при котором не происходит транскрипция и/или трансляция целевого гена или нуклеиновой кислоты. Транскрипция и трансляция гена, вызывающего заболевание, или гена с нарушенной функцией может быть ингибирована посредством нокаута, что приводит к предотвращению экспрессии белка.

Например, при редактировании или коррекции целевых гена или нуклеиновой кислоты с использованием комплекса gRNA-фермент CRISPR, то есть комплекса CRISPR, целевые ген или нуклеиновая кислота могут быть расщеплены с использованием комплекса CRISPR. Поврежденные целевые ген или нуклеиновая кислота могут быть репарированы посредством NHEJ с использованием комплекса CRISPR. Поврежденные целевые ген или нуклеиновая кислота могут иметь инсерционно-делеционные мутации, возникшие за счет NHEJ, и тем самым может быть индуцирован специфический нокаут целевого гена или нуклеиновой кислоты.

Нокадаун.

Термин "нокадаун" относится к снижению транскрипции и/или трансляции целевого гена или нуклеиновой кислоты или экспрессии целевого белка. Возникновение заболевания может быть предотвращено или заболевание может быть вылечено путем регуляции сверхэкспрессии гена или белка посредством нокадауна.

Например, при редактировании или корригировании целевого гена или нуклеиновой кислоты с использованием комплекса gRNA-неактивного фермента CRISPR-домена ингибиторной активности транскрипции, то есть неактивного комплекса CRISPR, включающего домен ингибиторной активности транскрипции, неактивный комплекс CRISPR может специфически связываться с целевыми геном или нуклеиновой кислотой, транскрипция целевого гена или нуклеиновой кислоты может быть ингибирована доменом ингибиторной активности транскрипции, включенным в неактивный комплекс CRISPR, за счет чего индуцируется нокадаун, при котором ингибируется экспрессия соответствующих гена или нуклеиновой кислоты.

Нокин.

Термин "нокин" относится к вставке специфических нуклеиновой кислоты или гена в целевые ген или нуклеиновую кислоту, и в данном случае термин "специфическая нуклеиновая кислота" относится к представляющим интерес гену или нуклеиновой кислоте, подлежащим вставке или экспрессии. Мутантный ген, запускающий заболевание, может быть использован в лечении заболевания с помощью коррекции до нормального или вставки нормального гена для индуцирования экспрессии нормального гена по-

средством нокина.

Кроме того, для нокина может дополнительно понадобиться донор.

Например, при редактировании или коррекции целевого гена или нуклеиновой кислоты с использованием комплекса gRNA-фермент CRISPR, то есть комплекса CRISPR, целевые ген или нуклеиновая кислота могут быть расщеплены с использованием комплекса CRISPR. Целевые ген или нуклеиновая кислота, поврежденные при использовании комплекса CRISPR, могут быть репарированы посредством HDR. В данном случае специфическая нуклеиновая кислота может быть вставлена в поврежденные ген или нуклеиновую кислоту с использованием донора.

Термин "донор" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая способствует репарации на основе HDR поврежденного гена или нуклеиновой кислоты, и в данном случае донор может включать специфическую нуклеиновую кислоту.

Донором может быть двух- или однонитевая нуклеиновая кислота. Донор может присутствовать в линейной или кольцевой форме.

Донор может включать последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую гомологией с целевыми геном или нуклеиновой кислотой.

Например, донор может включать последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую гомологией с каждой из последовательностей оснований в местоположениях, в которых специфическая нуклеиновая кислота подлежит вставке, например, в 3'-5'-направлении (слева) и 5'-3'-направлении (справа) поврежденной нуклеиновой кислоты. В данном случае специфическая нуклеиновая кислота, подлежащая вставке, может быть расположена между последовательностью нуклеиновой кислоты, обладающей гомологией с последовательностью оснований в 5'-3'-направлении поврежденной нуклеиновой кислоты, и последовательностью нуклеиновой кислоты, обладающей гомологией с последовательностью оснований в 3'-5'-направлении поврежденной нуклеиновой кислоты. В данном случае гомологичная последовательность нуклеиновой кислоты может характеризоваться по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или большей гомологией или полной гомологией.

Донор необязательно может включать дополнительную последовательность нуклеиновой кислоты. В данном случае дополнительная последовательность нуклеиновой кислоты может служить для усиления стабильности донора, эффективности нокина или эффективности HDR.

Например, дополнительной последовательностью нуклеиновой кислоты может быть А,Т-обогащенная последовательность нуклеиновой кислоты, то есть богатый А-Т домен. Кроме того, дополнительной последовательностью нуклеиновой кислоты может быть участок присоединения к остову/матрицы (SMAR).

В одном иллюстративном варианте осуществления, относящемуся к эффекту манипуляции с генами в соответствии с настоящим изобретением, подвергнутый манипуляции целевой ген, полученный с использованием комплекса gRNA-фермент CRISPR, то есть ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый манипуляции, может иметь следующее строение.

В одном иллюстративном варианте осуществления, если ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором является ген, то структура ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, подвергнутого искусственной манипуляции, с помощью комплекса gRNA-фермент CRISPR может включать модификацию одной или более нуклеиновых кислот наряду с делецией или вставкой одного или более нуклеотидов; замену одним или более нуклеотидами, отличными от нуклеотидов гена дикого типа и вставку одного или более чужеродных нуклеотидов в пределах непрерывного участка длиной от 1 п.о. до 50 п.о., от 1 п.о. до 40 п.о. или от 1 п.о. до 30 п.о., предпочтительно от 3 п.о. до 25 п.о. в последовательности оснований, которая располагается в последовательности РАМ в пределах последовательности нуклеиновой кислоты, из которой состоит ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор или смежной с ее 5'-концом и/или 3'-концом.

Кроме того, химическая модификация одного или более нуклеотидов может быть включена в последовательность нуклеиновой кислоты, из которой состоит ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор.

В данном случае термин "чужеродный нуклеотид" является понятием, включающим все экзогенные, например, гетерологичные или искусственно синтезированные нуклеотиды, отличные от нуклеотидов, природно включенные в ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор. Чужеродный нуклеотид также включает нуклеотид размером несколько сотен, тысяч или десятков тысяч п.о., предназначенный для экспрессии белка, обладающего специфической функцией, а также малый олигонуклеотид размером 50 п.о. или меньше. Такой чужеродный нуклеотид может быть донором.

Химическая модификация может включать метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, убиквитинилирование, АДФ-рибозилирование, миристилирование и гликозилирование, например, замену нескольких функциональных групп, содержащихся в нуклеотиде, любым из атома водорода, атома фтора, -О-алкильной группы, -О-ацильной группы и аминогруппы, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими. Кроме того, для усиления способности к переносу молекулы нуклеиновой кислоты функциональные группы также могут быть замещены любым из -Br, -Cl, -R, -R'OR, -SH, -SR, -N₃ и -CN (R=алкил, арил, алкилен). Кроме того, фосфатный каркас по меньшей мере одного нуклеотида может

быть замещен любой из алкилфосфонатной формы, фосфорамидатной формы и боранофосфатной формы. Кроме того, химическая модификация может представлять собой замену по меньшей мере одного типа нуклеотида, содержащегося в молекуле нуклеиновой кислоты, любым из закрытой нуклеиновой кислоты (LNA), незакрытой нуклеиновой кислоты (UNA), морфолино и пептидной нуклеиновой кислоты (PNA), и при этом химическая модификация может представлять собой связывание молекулы нуклеиновой кислоты с одним или более выбранными из группы, состоящей из липида, проникающего в клетку пептида и нацеливающего на клетку лиганда.

Для получения требуемой системы контроля биосинтеза ненасыщенных жирных кислот искусственная модификация с использованием комплекса gRNA-фермент CRISPR может быть применена в отношении нуклеиновой кислоты, из которой состоит ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор.

Участком, содержащим модификацию нуклеиновой кислоты ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, может быть целевой участок или целевая последовательность.

Такая целевая последовательность может быть мишенью для комплекса gRNA-фермент CRISPR, и при этом целевая последовательность может включать или не включать последовательность PAM, распознаваемую ферментом CRISPR. Такая целевая последовательность может обеспечивать важнейший стандарт на стадии разработки gRNA для специалистов в данной области техники.

Такая модификация нуклеиновой кислоты включает "расщепление" нуклеиновой кислоты.

Термин "расщепление" в целевом участке относится к разрыву ковалентного каркаса полинуклеотидов. Расщепление включает ферментативный или химический гидролиз фосфодиэфирной связи, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими, а также включает различные другие способы. Расщепление может быть выполнено как по одинарной нити, так и по двойной нити, и при этом расщепление двойной нити может быть результатом расщепления отдельных одинарных нитей. Расщепление двойной нити может давать тупые концы или ступенчатые концы.

При использовании инактивированного фермента CRISPR можно индуцировать фактор, обладающий специфической функцией для достижения некоторого участка в целевом участке или ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора без процесса расщепления. Химическая модификация одного или более нуклеотидов в последовательности нуклеиновой кислоты ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора может быть включена в соответствии с такой специфической функцией.

В одном примере могут иметь место различные инсерционно-делеционные мутации из-за целевых и нецелевых активностей посредством расщепления нуклеиновой кислоты, осуществленного комплексом gRNA-фермент CRISPR.

Термин "инсерционно-делеционная мутация" является общим термином для мутации по типу вставки или делеции, возникающей между некоторыми основаниями в последовательности оснований ДНК. Инсерционно-делеционная мутация может быть введена в целевую последовательность в ходе репарации механизмом HDR или NHEJ, если комплекс gRNA-фермент CRISPR расщепляет нуклеиновую кислоту (ДНК или РНК) ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, как описано выше.

Ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции, в соответствии с настоящим изобретением относится к модификации последовательности нуклеиновой кислоты оригинального гена путем расщепления, инсерционно-делеционных мутаций или вставки с использованием донора, такого как нуклеиновая кислота, и вносит вклад в требуемую систему контроля биосинтеза ненасыщенных жирных кислот, например, демонстрация эффекта стимулирования или подавления специфической ненасыщенной жирной кислоты.

Например, может быть экспрессирован специфический белок, и его активность можно стимулировать с помощью ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, подвергнутого искусственной манипуляции.

Специфический белок может быть инактивирован с помощью ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора.

В одном примере специфический целевой участок каждого ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора генома, например, обратимо регуляторных генов, таких как ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 и/или ген FAD8, может быть расщеплен, что приводит к нокауту или нокауту гена.

В качестве другого примера, нацеленный нокаут может быть опосредован с использованием ферментативно неактивного фермента CRISPR, слитого с доменом-репрессором транскрипции или модифицированным хроматином белком для изменения транскрипции, например, для блокирования, отрицательной регуляции или снижения транскрипции гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и/или гена FAD8.

Продуцирование ненасыщенных жирных кислот может регулировать с помощью ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, подвергнутого искусственной манипуляции.

Растительный организм с повышенным или сниженным содержанием специфической ненасыщен-

ной жирной кислоты или переработанный продукт с использованием растительного организма может быть получен с помощью ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, подвергнутого искусственной манипуляции.

В одном иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции, может обеспечивать разные ассоциированные с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот факторы, подвергнутые искусственной манипуляции, в соответствии с конституционной характеристикой комплекса gRNA-фермент CRISPR (например, включенного в целевой участок ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора или отличающегося смежной основной последовательностью PAM).

В дальнейшем в данном документе хотя были проиллюстрированы типичные примеры ферментов CRISPR и ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот гена, они являются исключительно конкретными примерами, и, таким образом, настоящее изобретение ими не ограничивается.

Например, если фермент CRISPR представляет собой белок SpCas9, то последовательность PAM представляет собой 5'-NGG-3' (N представляет собой A, T, G, или C), и расщепленный участок последовательности оснований (целевой участок) может представлять собой непрерывный участок из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о. или 21 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NGG-3' в целевом гене.

В настоящем изобретении может быть представлен ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции, например, подвергнутый искусственной манипуляции ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 и/или ген FAD8, который получен с помощью

a) делеции одного или более нуклеотидов непрерывного участка из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NGG-3' (N представляет собой A, T, C или G),

b) замены одного или более нуклеотидов непрерывного участка из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NGG-3', нуклеотидами, отличными от нуклеотидов гена дикого типа,

c) вставки одного или более нуклеотидов в непрерывный участок из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NGG-3', или

d) комбинации двух или более, выбранных из a) - c), в последовательности нуклеиновой кислоты ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора.

Например, если фермент CRISPR представляет собой белок CjCas9, то последовательность PAM представляет собой 5'-NNNNRYAC-3' (каждый N независимо представляет собой A, T, C или G, R представляет собой A или G, и Y представляет собой C или T), и расщепленный участок последовательности оснований (целевой участок) может представлять собой непрерывный участок из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о. или 21 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNNNRYAC-3' в целевом гене.

В настоящем изобретении может быть представлен ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции, например, подвергнутый искусственной манипуляции ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 и/или ген FAD8, который получен с помощью

a') делеции одного или более нуклеотидов непрерывного участка из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNNNRYAC-3' (каждый N независимо представляет собой A, T, C или G, R представляет собой A или G, и Y представляет собой C или T),

b') замены одного или более нуклеотидов непрерывного участка из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNNNRYAC-3', нуклеотидами, отличными от таких нуклеотидов гена дикого типа,

c') вставки одного или более нуклеотидов в непрерывный участок из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNNNRYAC-3', или

d') комбинации двух или более, выбранных из a') - c'), в последовательности нуклеиновой кислоты ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора.

Например, если фермент CRISPR представляет собой белок StCas9, то последовательность PAM представляет собой 5'-NNAGAAW-3' (каждый N независимо представляет собой A, T, C или G, и W представляет собой A или T), и расщепленный участок последовательности оснований (целевой участок) может представлять собой непрерывный участок из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о. или 21 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNAGAAW-3' в целевом гене.

В настоящем изобретении может быть представлен ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции, например, подвергнутый искусственной манипуляции ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 и/или ген FAD8, который получен с помощью

a") делеции одного или более нуклеотидов непрерывного участка из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом последовательности 5'-NNAGAAW-3' (каждый N независимо представляет собой A, T, C или G, и W представляет собой A или T),

b") замены одного или более нуклеотидов непрерывного участка из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNAGAAW-3', нуклеотидами, отличными от таких нуклеотидов гена дикого типа,

c") вставки одного или более нуклеотидов в непрерывный участок из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNAGAAW-3', или

d") комбинации двух или более, выбранных из a") - c"), в последовательности нуклеиновой кислоты ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора.

Например, если фермент CRISPR представляет собой белок NmCas9, то последовательность PAM представляет собой 5'-NNNNGATT-3' (каждый N независимо представляет собой A, T, C или G), и при этом расщепленный участок последовательности оснований (целевой участок) может представлять собой непрерывный участок из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о. или 21 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNNNGATT-3' в целевом гене.

В настоящем изобретении может быть представлен ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции, например, подвергнутый искусственной манипуляции ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 и/или ген FAD8, который получен с помощью

a") делеции одного или более нуклеотидов непрерывного участка из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNNNGATT-3' (каждый N независимо представляет собой A, T, C или G),

b") замены одного или более нуклеотидов непрерывного участка из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNNNGATT-3', нуклеотидами, отличными от таких нуклеотидов гена дикого типа,

c") вставки одного или более нуклеотидов в непрерывный участок из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с последовательностью 5'-NNNNGATT-3', или

d") комбинации двух или более, выбранных из a") - c"), в последовательности нуклеиновой кислоты ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора.

Например, если фермент CRISPR представляет собой белок SaCas9, то последовательность PAM представляет собой 5'-NNGRR(T)-3' (каждый N независимо представляет собой A, T, C или G, R представляет собой A или G, и (T) представляет собой произвольно добавляемую последовательность), и расщепленный участок последовательности оснований (целевой участок) может представлять собой непрерывный участок из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о. или 21 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNGRR(T)-3' в целевом гене.

В настоящем изобретении может быть представлен ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции, например, подвергнутый искусственной манипуляции ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 и/или ген FAD8, который получен с помощью

a"") делеции одного или более нуклеотидов непрерывного участка из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNGRR(T)-3' (каждый N независимо представляет собой A, T, C или G, R представляет собой A или G, и (T) представляет собой произвольно добавляемую последовательность),

b"") замены одного или более нуклеотидов непрерывного участка из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-NNGRR(T)-3', нуклеотидами, отличными от таких нуклеотидов гена дикого типа,

c"") вставки одного или более нуклеотидов в непрерывный участок из 1 п.о. - 25 п.о., например, 17 п.о. - 23 п.о., в последовательности оснований, смежной с последовательностью 5'-NNGRR(T)-3', или

d"") комбинации двух или более, выбранных из a"") - c""), в последовательности нуклеиновой кислоты ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора.

Например, если фермент CRISPR представляет собой белок Cpf1, то последовательность PAM представляет собой 5'-TTN-3' (N представляет собой A, T, C или G), и расщепленный участок последовательности оснований (целевой участок) может представлять собой непрерывный участок из 10 п.о. - 30 п.о., например, 15 п.о. - 26 п.о., 17 п.о. - 30 п.о. или 17 п.о. - 26 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом или 3'-концом последовательности 5'-TTN-3'.

Белок Cpf1 может быть получен из микроорганизма, такого как

Parcubacteria bacterium

(GWC2011_GWC2_44_17), *Lachnospiraceae bacterium* (MC2017), *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium* (GW2011_GWA_33_10), *Acidaminococcus sp.* (BV3L6), *Porphyromonas macacae*, *Lachnospiraceae bacterium* (ND2006), *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, *Moraxella bovoculi* (237), *Smiihella sp.* (SC_KO8D17), *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae bacterium* (MA2020), *Francisella novicida* (U112), *Candidatus Methanoplasma termitum* или *Eubacterium eligens*, например, *Parcubacteria bacterium* (GWC2011_GWC2_44_17), *Peregrinibacteria bacterium* (GW2011_GWA_33_10), *Acidaminococcus sp.* (BV3L6), *Porphyromonas macacae*, *Lachnospiraceae bacterium* (ND2006), *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens*, *Moraxella bovoculi* (237), *Leptospira inadai*, *Lachnospiraceae bacterium* (MA2020), *Francisella novicida* (U112), *Candidatus Methanoplasma termitum* или *Eubacterium eligens*,

при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

В настоящем изобретении может быть представлен ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции, например, подвергнутый искусственной манипуляции ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 и/или ген FAD8, который получен с помощью

a^{''''}) делеции одного или более нуклеотидов непрерывного участка из 10 п.о. - 30 п.о., например, 15 п.о. - 26 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-TTN-3' (N представляет собой A, T, C или G),

b^{''''}) замены одного или более нуклеотидов непрерывного участка из 10 п.о. - 30 п.о., например, 15 п.о. - 26 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-TTN-3', нуклеотидами, отличными от таких нуклеотидов гена дикого типа,

c^{''''}) вставки одного или более нуклеотидов непрерывного участка из 10 п.о. - 30 п.о., например, 15 п.о. - 26 п.о., в последовательности оснований, смежной с 5'-концом и/или 3'-концом последовательности 5'-TTN-3', или

d^{''''}) комбинации двух или более, выбранных из a^{''''}) - c^{''''}), в последовательности нуклеиновой кислоты ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора.

В другом иллюстративном варианте осуществления, если ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором является белок, то подвергнутый искусственной манипуляции белок включает все белки, вовлекаемые в осуществление нового или модифицированного биосинтеза ненасыщенных жирных кислот с помощью прямого или опосредованного действия комплекса gRNA-фермент CRISPR.

Например, подвергнутый искусственной манипуляции белок может представлять собой белок, экспрессированный ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором (геном), подвергнутым искусственной манипуляции с помощью комплекса gRNA-фермент CRISPR или другого белка, содержание которого повышено или снижено за счет воздействия такой активности белка, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

Подвергнутый искусственной манипуляции ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор (белок) может иметь аминокислотный состав и активность, соответствующую составу подвергнутого искусственной манипуляции ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора (гена).

В качестве одного варианта осуществления может быть представлен (i) подвергнутый искусственной манипуляции белок, характеристики экспрессии которого изменяются.

Например, модификация белка может обладать одной или более следующими характеристиками:

снижение или повышение уровня экспрессии в соответствии с делецией или вставкой одного или более нуклеотидов в непрерывном участке из 1 п.о. - 50 п.о., 1 п.о. - 40 п.о., 1 п.о. - 30 п.о. и предпочтительно 3 п.о. - 25 п.о. в последовательности оснований последовательности РАМ в последовательности нуклеиновой кислоты ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора или смежно с ее 5'-концом и/или 3'-концом;

снижение или повышение уровня экспрессии в соответствии с заменой одним или более нуклеотидами, отличными от таких нуклеотидов гена дикого типа;

снижение или повышение уровня экспрессии, экспрессии слитого белка или независимой экспрессии специфического белка в соответствии со вставкой одного или более чужеродных нуклеотидов; и

снижение или повышение уровня экспрессии третьего белка под влиянием характеристик экспрессии вышеописанных белков.

Может быть представлен (iii) подвергнутый искусственной манипуляции белок, структурные характеристики которого изменяются.

Например, модификация белка может обладать одной или более следующими характеристиками:

изменение в кодонах, аминокислотах и трехмерной структуре в соответствии с делецией или вставкой одного или более нуклеотидов в непрерывном участке из 1 п.о. - 50 п.о., 1 п.о. - 40 п.о., 1 п.о. - 30 п.о. и предпочтительно 3 п.о. - 25 п.о. в последовательности оснований последовательности РАМ в последовательности нуклеиновой кислоты ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора или смежно с ее 5'-концом и/или 3'-концом;

изменение в кодонах, аминокислотах и вследствие этого в трехмерной структуре в соответствии с заменой одним или более нуклеотидами, отличными от нуклеотидов гена дикого типа;

изменение в кодонах, аминокислотах и трехмерной структуре или слитой со специфическим белком структуры или независимой структурой, из которой выделен специфический белок, в соответствии со вставкой одного или более чужеродных нуклеотидов; и

изменение в кодонах, аминокислотах и трехмерной структуре третьего белка под влиянием вышеописанного белка с измененной структурной характеристикой.

Может быть представлен (iii) подвергнутый искусственной манипуляции белок, функциональные характеристики которого изменяются.

Например, модификация белка может обладать одной или более следующими характеристиками:

активация или инактивация специфической функции за счет модификации белка, вызванной делецией или вставкой одного или более нуклеотидов в непрерывном участке из 1 п.о. - 50 п.о., 1 п.о. - 40 п.о., 1 п.о. - 30 п.о. и предпочтительно 3 п.о. - 25 п.о. в последовательности оснований последовательности РАМ в последовательности нуклеиновой кислоты ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора или смежно с ее 5'-концом и/или 3'-концом;

активация или инактивация специфической функции или введение новой функции за счет модификации белка, вызванной заменой одним или более нуклеотидами, отличными от таких нуклеотидов гена дикого типа;

активация или инактивация специфической функции или введение новой функции за счет модификации белка, вызванной вставкой одного или более чужеродных нуклеотидов, в частности, введение третьей функции дополнительно к существующей функции за счет слияния или независимой экспрессии специфического белка; и

изменение функции третьего белка под влиянием вышеописанного белка с измененными функциональными характеристиками.

Кроме того, может быть включен белок, подвергнутый искусственной манипуляции с помощью химической модификацией одного или более нуклеотидов в последовательности нуклеиновой кислоты, из которой состоит ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор.

Например, могут быть изменены одна или несколько из экспрессии, структурных и функциональных характеристик белка, вызванных метилированием, ацетилизированием, фосфорилированием, убиквитинилированием, ADP-рибозилированием, миристилированием и гликозилированием.

Например, третья структура и функция могут быть получены путем связывания третьего белка с последовательностью нуклеиновой кислоты гена за счет химической модификации нуклеотидов.

5. Другие дополнительные компоненты.

Дополнительный компонент может быть избирательно добавлен для усиления эффективности комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок или для улучшения эффективности репарации поврежденных гена или нуклеиновой кислоты.

Дополнительный компонент может быть избирательно использован для улучшения эффективности комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

Активатор.

Дополнительный компонент может быть использован в качестве активатора для повышения эффективности расщепления целевых нуклеиновой кислоты, гена или хромосомы комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

Термин "активатор" относится к нуклеиновой кислоте, которая служит для стабилизации связи между комплексом направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок и целевыми нуклеиновой кислотой, геном или хромосомой или для обеспечения более легкого достижения комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок целевых нуклеиновой кислоты, гена или хромосомы.

Активатор может представлять собой двухнитевую нуклеиновую кислоту или одонитевую нуклеиновую кислоту.

Активатор может быть линейным или кольцевым.

Активатор можно быть разделен на "хелпер", который стабилизирует связь между комплексом направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок и целевыми нуклеиновой кислотой, геном или хромосомой, и "сопроводитель", который служит для обеспечения более легкого достижения комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок целевых нуклеиновой кислоты, гена или хромосомы.

Хелпер может повышать эффективность расщепления комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок в отношении целевых нуклеиновой кислоты, гена или хромосомы.

Например, хелпер включает последовательность нуклеиновой кислоты, обладающей гомологией с целевыми нуклеиновой кислотой, геном или хромосомой. Поэтому если комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок связан с целевыми нуклеиновой кислотой, геном или хромосомой, то гомологичная последовательность нуклеиновой кислоты, включенная в хелпер, может образовывать дополнительную комплементарную связь с целевыми нуклеиновой кислотой, геном или хромосомой для стабилизации связи между комплексом направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок и целевыми нуклеиновой кислотой, геном или хромосомой.

Сопроводитель может повышать эффективность расщепления комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок в отношении целевых нуклеиновой кислоты, гена или хромосомы.

Например, сопроводитель включает последовательность нуклеиновой кислоты, обладающей гомологией с целевыми нуклеиновой кислотой, геном или хромосомой. В данном случае гомологичная последовательность нуклеиновой кислоты, включенная в сопроводитель, может частично образовывать комплементарную связь с направляющей нуклеиновой кислотой комплекса направляющая нуклеиновая кислота редактирующий белок. Следовательно, сопроводитель, частично образующий комплементарную связь с комплексом направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок, может частично образовывать комплементарную связь с целевыми нуклеиновой кислотой, геном или хромосомой и в результате может обеспечивать точное достижение комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок местоположения целевых нуклеиновой кислоты, гена или хромосомы.

Гомологичная последовательность нуклеиновой кислоты может характеризоваться по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или большей гомологией или полной гомологией.

Кроме того, избирательно может быть использован дополнительный компонент для улучшения эффективности репарации поврежденных гена или нуклеиновой кислоты.

Помощник.

Может быть использован дополнительный компонент в качестве помощника для улучшения эффективности репарации поврежденных гена или нуклеиновой кислоты.

Термин "помощник" относится к нуклеиновой кислоте, которая участвует в процессе репарации или повышает эффективность репарации поврежденных гена или нуклеиновой кислоты, например, гена или нуклеиновой кислоты, расщепленного комплексом направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

Помощник может представлять собой двухнитевую нуклеиновую кислоту или одонитевую нуклеиновую кислоту.

Помощник может присутствовать в линейной или кольцевой форме.

Помощник может быть разделен на "помощника NHEJ", который участвует в процессе репарации с использованием NHEJ или улучшает эффективность репарации, и "помощника HDR", который участвует в процессе репарации с использованием HDR или улучшает эффективность репарации в соответствии со способом репарации.

Помощник NHEJ может участвовать в процессе репарации или улучшать эффективность репарации поврежденных гена или нуклеиновой кислоты с использованием NHEJ.

Например, помощник NHEJ может включать последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую гомологией с частью поврежденной последовательности нуклеиновой кислоты. В данном случае гомологичная последовательность нуклеиновой кислоты может включать последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую гомологией с последовательностью нуклеиновой кислоты на одном конце (например, 3'-конце) поврежденной последовательности нуклеиновой кислоты, и включать последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую гомологией с последовательностью нуклеиновой кислоты на другом конце (например, 5'-конце) поврежденной последовательности нуклеиновой кислоты. Кроме того, может быть включена последовательность нуклеиновой кислоты, обладающая гомологией с каждой из последовательностей оснований в 3'-5'-направлении и в 5'-3'-направлении поврежденной последовательности нуклеиновой кислоты. Последовательность нуклеиновой кислоты, обладающая такой гомологией, может помочь разместить две части поврежденной последовательности нуклеиновой кислоты в непосредственной близости, за счет чего повышается эффективность репарации поврежденной нуклеиновой кислоты с помощью NHEJ.

Помощник HDR может участвовать в процессе репарации или улучшать эффективность репарации поврежденных гена или нуклеиновой кислоты с использованием HDR.

Например, помощник HDR может включать последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую гомологией с частью поврежденной последовательности нуклеиновой кислоты. В данном случае гомологичная последовательность нуклеиновой кислоты может включать последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую гомологией с последовательностью нуклеиновой кислоты на одном конце (например, 3'-конце) поврежденной последовательности нуклеиновой кислоты, и последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую гомологией с последовательностью нуклеиновой кислоты на другом

конце (например, 5'-конце) поврежденной последовательности нуклеиновой кислоты. В качестве альтернативы может быть включена последовательность нуклеиновой кислоты, обладающая гомологией с каждой из последовательностей оснований в 3'-5'-направлении и в 5'-3'-направлении поврежденной последовательности нуклеиновой кислоты. Последовательность нуклеиновой кислоты, обладающая такой гомологией, может служить в качестве матрицы для поврежденной последовательности нуклеиновой кислоты с целью повышения эффективности репарации поврежденной нуклеиновой кислоты с помощью HDR.

В качестве другого примера помощник HDR может включать последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую гомологией с частью поврежденной последовательности нуклеиновой кислоты и специфической нуклеиновой кислотой, например, нуклеиновой кислотой или геном, подлежащими вставке. В данном случае гомологичная последовательность нуклеиновой кислоты может включать последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую гомологией с каждой из последовательностей оснований в 3'-5'-направлении и в 5'-3'-направлении поврежденной последовательности нуклеиновой кислоты. Специфическая нуклеиновая кислота может быть расположена между последовательностью нуклеиновой кислоты, обладающей гомологией с последовательностью оснований в 5'-3'-направлении поврежденной нуклеиновой кислоты, и последовательностью нуклеиновой кислоты, обладающей гомологией с последовательностью оснований в 3'-5'-направлении поврежденной нуклеиновой кислоты. Последовательность нуклеиновой кислоты, обладающая такой гомологией, и специфическая нуклеиновая кислота могут служить в качестве донора для вставки специфической нуклеиновой кислоты в поврежденную нуклеиновую кислоту, за счет чего повышается эффективность HDR в отношении нокина.

Гомологичная последовательность нуклеиновой кислоты может характеризоваться по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или большей гомологией или полной гомологией.

6. Субъект.

Термин "субъект" относится к организму, в который введены направляющая нуклеиновая кислота, редактирующий белок или комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок, к организму, в котором функционирует направляющая нуклеиновая кислота, редактирующий белок или комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок, или к пробе или образцу, полученным из организма.

Субъект может представлять собой организм, содержащий целевые нуклеиновую кислоту, ген, хромосому или белок комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

Организм может представлять собой клетки, ткани или растение. Клетки могут представлять собой эукариотические клетки. Эукариотические клетки могут представлять собой клетки растения.

Ткань может представлять собой ткань растения, такую как лист, стебель, корень, цветок, плод или каллюс и т.п., и т.д.

Растение может представлять собой растение в различных периодах от семени до зрелого организма.

Растение может представлять собой растительный организм, содержащий ненасыщенные жирные кислоты.

Кроме того, субъект может представлять собой пробу или образец, содержащие целевые нуклеиновую кислоту, ген, хромосому или белок комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

Проба или образец могут быть получены из растительного организма.

В соответствии с настоящим изобретением в качестве конкретного примера субъект может содержать целевые ген или нуклеиновую кислоту комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

В данном случае целевой ген может представлять собой ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, например, ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 и/или ген FAD8.

Целевой ген может представлять собой ген дикого типа или модифицированную форму в диком типе.

В одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения субъект может содержать ген или нуклеиновую кислоту, подвергнутые манипуляции с помощью комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

В данном случае подвергнутый манипуляции ген может представлять собой ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, например, ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 и/или ген FAD8.

В данном случае направляющая нуклеиновая кислота может нацеливаться на ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, например, ген FAD2, ген FAD3, ген FAD6, ген FAD7 и/или ген FAD8.

Направляющая нуклеиновая кислота может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную целевой последовательности гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и/или гена FAD8.

Направляющая нуклеиновая кислота может нацеливаться на один или более генов.

Направляющая нуклеиновая кислота может одновременно нацеливаться на два или более генов. В данном случае двумя или более генами могут быть гомологичные или гетерологичные гены.

Направляющая нуклеиновая кислота может нацеливаться на одну или более целевых последовательностей.

Направляющая нуклеиновая кислота может быть сконструирована в разных формах в соответствии с количеством или расположениями целевых последовательностей.

В одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения направляющая нуклеиновая кислота может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарную одной или более целевым последовательностям последовательностей, приведенных в табл. 1.

В определенном варианте осуществления для искусственной манипуляции с геном FAD2 представлена направляющая последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующая любой из целевых последовательностей под SEQ ID NO: 1-30.

В определенном варианте осуществления для искусственной манипуляции с геном FAD2 представлен редактирующий белок, который взаимодействует с направляющей последовательностью нуклеиновой кислоты, соответствующей, например, образованию комплекса с любой из целевых последовательностей под SEQ ID NO: 1-30, например, SEQ ID NO: 7 или 30.

В определенном варианте осуществления представлены продукт модификации нуклеиновой кислоты каждого гена, в котором осуществляется искусственная манипуляция в участке целевой последовательности под любым из SEQ ID NO: 1-30, например, SEQ ID NO: 7 или 30, и продукт его экспрессии.

7. Доставка.

Направляющая нуклеиновая кислота, редактирующий белок или комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок могут быть доставлены субъекту или введены в субъекта с помощью различных способов доставки и различных форм.

Направляющая нуклеиновая кислота может быть доставлена или введена в субъекта в форме ДНК, РНК или в смешанной форме.

Редактирующий белок может быть доставлен субъекту или введен в субъект в форме ДНК, РНК, смеси ДНК/РНК, пептида, полипептида, каждое из которых кодирует редактирующий белок, или в форме белка.

Комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может быть доставлен к мишени или введен в мишень в форме ДНК, РНК или их комбинации, которая кодирует каждый компонент, то есть направляющую нуклеиновую кислоту или редактирующий белок.

Комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок может быть доставлен субъекту или введен в субъект в виде комплекса направляющей нуклеиновой кислоты, имеющей форму ДНК, РНК или их смеси, и редактирующего белка, имеющего форму пептида, полипептида или белка.

Кроме того, дополнительный компонент, способный повышать или ингибировать эффективность комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок, может быть доставлен субъекту или введен в субъект с помощью различных способов доставки и в различных формах.

Дополнительный компонент может быть доставлен субъекту или введен в субъект в форме ДНК, РНК, смеси ДНК/РНК, пептида, полипептида или белка.

1) Доставка в форме ДНК, РНК или их смеси.

Направляющая нуклеиновая кислота и/или редактирующий белок кодируются в форме ДНК, РНК или их смеси, которая может быть доставлена субъекту или введена в субъект с помощью способа, известного из уровня техники.

Или направляющая нуклеиновая кислота и/или редактирующий белок кодируются в форме ДНК, РНК или их смеси, которая может быть доставлена субъекту или введена в субъект с помощью вектора, без использования вектора или их комбинации.

Вектор может представлять собой вирусный вектор или вектор невирусного происхождения (например, плазмиду).

Форма, не являющаяся вектором, может представлять собой голую ДНК, комплекс ДНК или мРНК.

Введение на основе вектора.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая направляющую нуклеиновую кислоту и/или редактирующий белок, может быть доставлена субъекту или введена в субъект с помощью вектора.

Вектор может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую направляющую нуклеиновую кислоту и/или редактирующий белок.

Например, вектор может одновременно включать последовательности нуклеиновой кислоты, которые соответственно кодируют направляющую нуклеиновую кислоту и редактирующий белок.

Например, вектор может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую направляющую нуклеиновую кислоту.

В качестве примера домены, включенные в направляющую нуклеиновую кислоту, могут содержаться все вместе в одном векторе, или их можно разделить, а затем встроить в разные векторы.

Например, вектор может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую редак-

тирующий белок.

В одном примере в случае редактирующего белка последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие редактирующий белок, могут содержаться в одном векторе, или их можно разделить, а затем включить в несколько векторов.

Вектор может включать один или более регуляторных/контрольных компонентов.

В данном случае регуляторные/контрольные компоненты могут включать промотор, энхансер, интрон, сигнал полиаденилирования, консенсусную последовательность Козак, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), акцептор сплайсинга и/или последовательность 2A.

Промотор может представлять собой промотор, распознаваемый РНК-полимеразой II. Промотор может представлять собой промотор, распознаваемый РНК-полимеразой III. Промотор может представлять собой индуцируемый промотор. Промотор может представлять собой специфический для субъекта промотор. Промотор может представлять собой вирусный или невирусный промотор.

В случае промотора может использоваться подходящий промотор в соответствии с контрольным участком (то есть последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей направляющую нуклеиновую кислоту или редактирующий белок).

Например, промотор, применимый для направляющей нуклеиновой кислоты, может представлять собой промотор H1, EF-1a, тРНК или U6. Например, промотор, применимый для редактирующего белка, может представлять собой промотор CMV, EF-1a, EFS, MSCV, PGK или CAG.

Например, промотор, применимый для направляющей нуклеиновой кислоты и/или редактирующего белка, может представлять собой специфический для корня промотор экспрессии, специфический для семени промотор, индуцируемый во всем организме промотор экспрессии или специфический для листа или другой ткани промотор.

Вектор может представлять собой вирусный вектор или рекомбинантный вирусный вектор.

Вирус может представлять собой ДНК-содержащий вирус или РНК-содержащий вирус.

В данном случае ДНК-содержащий вирус может представлять собой вирус с двухнитевой ДНК (dsDNA) или вирус с однонитевой ДНК (ssDNA).

В данном случае РНК-содержащий вирус может представлять собой вирус с однонитевой РНК (ssRNA).

Вирус может представлять собой вирус мозаики, ретровирус, лентивирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), вирус осповакцины, поксвирус или вирус простого герпеса, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

Как правило, вирус может инфицировать хозяина (например, клетки) с введением таким образом нуклеиновой кислоты, кодирующей генетическую информацию вируса у хозяина, или со вставкой нуклеиновой кислоты, кодирующей генетическую информацию, в геном хозяина. Направляющая нуклеиновая кислота и/или редактирующий белок могут быть введены субъекту с использованием вируса, обладающего такой характеристикой. Направляющая нуклеиновая кислота и/или редактирующий белок, введенные с использованием вируса, могут временно экспрессироваться в субъекте (например, в клетках). В качестве альтернативы направляющая нуклеиновая кислота и/или редактирующий белок, введенные с использованием вируса, могут постоянно экспрессироваться в субъекте (например, в клетках) на протяжении длительного периода времени (например, 1, 2 или 3 недели, 1, 2, 3, 6 или 9 месяцев, 1 или 2 года или постоянно).

Пакующая способность вируса может варьировать от по меньшей мере 2 т.п. до 50 т.п. в соответствии с типом вируса. В зависимости от такой пакующей способности может быть сконструирован вирусный вектор, включающий направляющую нуклеиновую кислоту или редактирующий белок, или вирусный вектор, включающий и направляющую нуклеиновую кислоту, и редактирующий белок. В качестве альтернативы может быть сконструирован вирусный вектор, включающий направляющую нуклеиновую кислоту, редактирующий белок и дополнительные компоненты.

В одном примере последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая направляющую нуклеиновую кислоту и/или редактирующий белок, может быть доставлена или введена с помощью рекомбинантного вируса мозаики.

В качестве другого примера последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая направляющую нуклеиновую кислоту и/или редактирующий белок, может быть доставлена или введена с помощью рекомбинантного аденовируса.

В качестве следующего примера последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая направляющую нуклеиновую кислоту и/или редактирующий белок, может быть доставлена или введена с помощью рекомбинантного AAV.

В качестве другого примера последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая направляющую нуклеиновую кислоту и/или редактирующий белок, может быть доставлена или введена с помощью гибридного вируса, например, одного или более гибридов вируса, приведенного в настоящем документе.

Кроме того, вектор может быть включен в бактерию и введен в субъект.

В данном случае вектор может быть включен в *Agrobacterium* и введен в субъект, при этом настоящее изобретение не ограничивается этим.

Как правило, наиболее широко применяется способ переноса необходимого генетического материала в субъекта с использованием агробактерий, и в случае с растением для генетической модификации растения ДНК агробактерий может быть вставлена в хромосому растительного организма в форме нуклеиновая кислота-белок, называемой плазмидой. Она может служить для переноса генетического материала в клетки растительного организма, при этом перенесенный генетический материал сливается в клетках. Вышеописанный способ может быть широко использован получения генномодифицированной культуры *Agrobacterium*, и, кроме того, он также может быть использован в качестве системы для исследования реакции клеток на генетическую трансформацию.

Введение, отличное от векторного.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая направляющую нуклеиновую кислоту и/или редактирующий белок может, быть доставлена субъекту или введена в субъект с помощью формы, не являющейся вектором.

Форма, не являющаяся вектором, может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую направляющую нуклеиновую кислоту и/или редактирующий белок.

Форма, не являющаяся вектором, может представлять собой голую ДНК, комплекс ДНК, мРНК или их комбинацию.

Форма, не являющаяся вектором, может быть доставлена субъекту или введена в субъект с помощью электропорации, бомбардировки частицами, обработки ультразвуком, магнитофекции, временных компрессии или сжатия клетки (например, как описано в литературном источнике [Lee, et al. (2012) *Nano Lett.*, 12, 6322-6327]), опосредованной липидами трансфекции, дендримера, наночастиц, фосфата кальция, диоксида кремния, силиката (Ormosil) или их комбинации.

В качестве примера доставка посредством электропорации может быть выполнена путем смешивания клеток и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей направляющую нуклеиновую кислоту и/или редактирующий белок, в картридже, камере или кювете и приложения в отношении клеток электрического стимула с заданными продолжительностью и амплитудой.

В качестве другого примера, форма, не являющаяся вектором, может быть доставлена с использованием наночастиц. Наночастицы могут представлять собой неорганические наночастицы (например, магнитные наночастицы, наночастицы диоксида кремния и т. д.) или органические наночастицы (например, покрытый полиэтиленгликолем (PEG) липид и т. д.). Наружная поверхность наночастиц может быть конъюгирована с положительно заряженным полимером, который способен прикрепляться (например, полиэтиленимин, полилизин, полисерин и т. д.).

В определенном варианте осуществления форма, не являющаяся вектором, может быть доставлена с использованием липидной оболочки.

В определенном варианте осуществления форма, не являющаяся вектором, может быть доставлена с использованием экзосомы. Экзосома представляет собой эндогенную нановезикулу для переноса белка и РНК, которая может доставлять РНК в головной мозг и другой целевой орган.

В определенном варианте осуществления форма, не являющаяся вектором, может быть доставлена с использованием липосомы. Липосома представляет собой сферическую везикулярную структуру, которая состоит из одно- или многослойного ламеллярного липидного бислоя, окружающего внутренние водные компартменты, и наружного липофильного фосфолипидного бислоя, который является относительно непрозрачным. Хотя липосома может быть изготовлена из нескольких различных типов липидов, фосфолипиды наиболее широко используются для получения липосомы в качестве носителя лекарственного средства.

Могут быть включены другие добавки.

ii) Доставка в форме пептида, полипептида или белка.

Редактирующий белок в форме пептида, полипептида или белка может быть доставлен субъекту или введен в субъект с помощью известного из уровня техники способа.

Пептидная, полипептидная или белковая формы могут быть доставлены субъекту или введены в субъекта с помощью электропорации, микроинъекции, временных компрессии или сжатия клетки (например, как описано в литературе [Lee, et al. (2012) *Nano Lett.*, 12, 6322-6327]), опосредованной липидами трансфекции, наночастиц, липосомы, опосредованной пептидом доставки или их комбинации.

Пептид, полипептид или белок могут быть доставлены с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей направляющую нуклеиновую кислоту.

В одном примере перенос посредством электропорации может быть выполнен путем смешивания клеток, в которые будет введен редактирующий белок с направляющей нуклеиновой кислотой или без нее, в картридже, камере или кювете и путем приложения к клеткам электрического стимула с заданными продолжительностью и амплитудой.

iii) Доставка в форме смеси нуклеиновая кислота-белок.

Направляющая нуклеиновая кислота и редактирующий белок могут быть доставлены субъекту или введены в субъекта в форме комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

Например, направляющая нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, РНК или их комбинацию. Редактирующий белок может представлять собой пептид, полипептид или белок.

В одном примере направляющая нуклеиновая кислота и редактирующий белок могут быть доставлены субъекту или введены в субъекта в форме комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок, содержащего направляющую нуклеиновую кислоту типа РНК и редактирующий белок типа белка, то есть рибонуклеопротеина (RNP).

В соответствии с настоящим изобретением в качестве варианта осуществления способа доставки направляющей нуклеиновой кислоты и/или редактирующего белка в субъект ниже будет описана доставка gRNA, фермента CRISPR или комплекса gRNA-фермент CRISPR.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая gRNA и/или фермент CRISPR, будет доставлена субъекту или введена в субъекта с использованием вектора.

Вектор может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую gRNA и/или фермент CRISPR.

Например, вектор может одновременно включать последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие gRNA и фермент CRISPR.

Например, вектор может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую gRNA.

В одном примере домены, содержащиеся в gRNA, могут содержаться в одном векторе, или их можно разделить, а затем встроить в разные векторы.

Например, вектор может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент CRISPR.

В одном примере в случае фермента CRISPR последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей фермент CRISPR, могут содержаться в одном векторе, или их можно разделить, а затем встроить в несколько векторов.

Вектор может включать один или более регуляторных/контрольных компонентов.

В данном случае регуляторные/контрольные компоненты могут включать промотор, энхансер, интрон, сигнал полиаденилирования, консенсусную последовательность.

Козак, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), акцептор сплайсинга и/или последовательность 2A.

Промотор может представлять собой промотор, распознаваемый РНК-полимеразой II. Промотор может представлять собой промотор, распознаваемый РНК-полимеразой III. Промотор может представлять собой индуцируемый промотор. Промотор может представлять собой специфический для субъекта промотор. Промотор может представлять собой вирусный или невирусный промотор.

В случае промотора может использоваться подходящий промотор в соответствии с контрольным участком (то есть последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей gRNA и/или фермент CRISPR).

Например, промотор, применимый для gRNA, может представлять собой промотор H1, EF-1a, тРНК или U6. Например, промотор, применимый для фермента CRISPR, может представлять собой промотор CMV, EF-1a, EFS, MSCV, PGK или CAG.

Например, промотор, применимый для направляющей нуклеиновой кислоты и/или редактирующего белка, может представлять собой специфический для корня промотор экспрессии, специфический для семени промотор, индуцируемый во всем организме промотор экспрессии или специфический для листа или другой ткани промотор.

Вектор может представлять собой вирусный вектор или рекомбинантный вирусный вектор.

Вирус может представлять собой ДНК-содержащий вирус или РНК-содержащий вирус.

В данном случае ДНК-содержащий вирус может представлять собой вирус с двухнитевой ДНК (dsDNA) или вирус с однонитевой ДНК (ssDNA).

В данном случае РНК-содержащий вирус может представлять собой вирус с однонитевой РНК (ssRNA).

Вирус может представлять собой вирус мозаики, ретровирус, лентивирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), вирус осповакцины, поксвирус или вирус простого герпеса, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

Как правило, вирус может инфицировать хозяина (например, клетки) с введением таким образом нуклеиновой кислоты, кодирующей генетическую информацию вируса у хозяина, или со вставкой нуклеиновой кислоты, кодирующей генетическую информацию, в геном хозяина. gRNA и/или фермент CRISPR могут быть введены в субъекта с использованием вируса, обладающего такой характеристикой. gRNA и/или фермент CRISPR, введенные с использованием вируса, могут временно экспрессироваться в субъекте (например, в клетках). В качестве альтернативы gRNA и/или фермент CRISPR, введенные с использованием вируса, могут постоянно экспрессироваться у субъекта (например, у клеток) на протяжении длительного периода времени (например, 1, 2 или 3 недели, 1, 2, 3, 6 или 9 месяцев, 1 или 2 года или постоянно).

Пакующая способность вируса может варьировать от по меньшей мере 2 т.п. до 50 т.п. в соответствии с типом вируса. В зависимости от такой пакующей способности может быть сконструирован вирусный вектор, включающий только gRNA или фермент CRISPR, или вирусный вектор, включающий и

gRNA, и фермент CRISPR. В качестве альтернативы может быть сконструирован вирусный вектор, включающий gRNA, фермент CRISPR и дополнительные компоненты.

В одном примере последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая gRNA и/или фермент CRISPR, может быть доставлена или введена с помощью рекомбинантного вируса мозаики.

В качестве другого примера последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая gRNA и/или фермент CRISPR, может быть доставлена или введена с помощью рекомбинантного аденовируса.

В качестве следующего примера последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая gRNA и/или фермент CRISPR, может быть доставлена или введена с помощью рекомбинантного AAV.

В качестве другого примера последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая gRNA и/или фермент CRISPR, может быть доставлена или введена с помощью одного или более гибридов гибридных вирусов, например, вирусов, описанных в настоящем документе.

Вектор может быть включен в бактерию и введен в субъект.

В данном случае вектор может быть включен в *Agrobacterium* и введен в субъект, при этом настоящее изобретение не ограничивается этим.

В качестве примера вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты (нуклеиновых кислот), кодирующую gRNA и/или фермент CRISPR, может быть включен в *Agrobacterium* и введен в растительный организм.

В одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения комплекс gRNA-фермент CRISPR может быть доставлен субъекту или введен в субъект.

Например, gRNA может присутствовать в форме ДНК, РНК или их комбинации. Фермент CRISPR может присутствовать в форме пептида, полипептида или белка.

В одном примере gRNA и фермент CRISPR могут быть доставлены субъекту или введены в субъекта в форме комплекса gRNA-фермент CRISPR, включающего gRNA типа РНК и CRISPR типа белка, то есть рибонуклеопротеина (RNP).

Комплекс gRNA-фермент CRISPR может быть доставлен субъекту или введен в субъект с помощью электропорации, микроинъекции, временных компрессии или сжатия клетки (например, как описано в литературном источнике [Lee, et al. (2012) *Nano Lett.*, 12, 6322-6327]), опосредованной липидами трансфекции, наночастиц, липосомы, опосредованной пептидом доставки или их комбинации.

8. Трансформант.

Термин "трансформант" относится к организму, в который вводят направляющую нуклеиновую кислоту, редактирующий белок или комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок, к организму, в котором экспрессируются направляющая нуклеиновая кислота, редактирующий белок или комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок, или к пробе или образцу, полученным из организма.

Трансформант может представлять собой организм, в который вводят направляющую нуклеиновую кислоту, редактирующий белок или комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок в форме ДНК, РНК или их комбинации.

Например, трансформант может представлять собой организм, в который введен вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую направляющую нуклеиновую кислоту и/или редактирующий белок. В данном случае вектор может представлять собой вектор, не являющийся вирусом, вирусный вектор или рекомбинантный вирусный вектор.

В качестве другого примера трансформант может представлять собой организм, в который введена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая направляющую нуклеиновую кислоту и/или редактирующий белок, в форме, не являющейся вектором. В данном случае форма, не являющаяся вектором, может представлять собой голую ДНК, комплекс ДНК, мРНК или их комбинацию.

Трансформант может представлять собой организм, в который введены направляющая нуклеиновая кислота, редактирующий белок или комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок в форме пептида, полипептида или белка.

Трансформант может представлять собой организм, в который введены направляющая нуклеиновая кислота, редактирующий белок или комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок в форме ДНК, РНК, пептида, полипептида, белка или их комбинации.

Например, трансформант может представлять собой организм, в который введен комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок, включающий направляющую нуклеиновую кислоту типа РНК и редактирующий белок типа белка.

Трансформант может представлять собой организм, включающий целевые нуклеиновую кислоту, ген, хромосому или белок комплекса направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

Организм может представлять собой клетки, ткань или растение.

Клетки могут представлять собой прокариотические клетки или эукариотические клетки.

Эукариотические клетки могут представлять собой клетки растения, при этом настоящее изобретение не ограничивается ими.

Ткань может представлять собой ткань растительного организма, такую как корень, стебель, лист, цветок, плод или каллус и т.п., и т.д.

Трансформант может представлять собой растительный организм, в который введены или в котором экспрессируются направляющая нуклеиновая кислота, редактирующий белок или комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок, или пробу или образец, полученные из растительного организма.

Проба или образец могут представлять собой корень, стебель, лист, цветок, плод, каллус или их клетки.

Применение.

Один типичный вариант осуществления настоящего изобретения относится к применению композиции для искусственной манипуляции с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором у субъекта, такого как растение, к растительному организму, в котором содержание специфической ненасыщенной жирной кислоты контролируется ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором, подвергнутым искусственной манипуляции, или к переработанному продукту с его применением.

Специфические ненасыщенные жирные кислоты Соя (*Glycine max* L.).

Соя является наиболее широко культивируемой культурой в мире и дает растительное масло и белки наивысшего качества в контексте производства и использования. Технология трансформации широко используется для улучшения генетических характеристик различных эффективных генов в сое. Трансгенный растительный организм сои был сконструирован с использованием системы для трансформации с использованием основанного на *Agrobacterium* способа семядольных узлов (CN) (Hinchey et al., 1988, *Nat. Biotechnol.*, Vol. 6, 915-922), и недавно система для получения стабильного трансформанта была улучшена с использованием эксплантатов с половиной семени (Paz et al., 2006, *Plant Cell Rep.*, Vol. 25, 206-213). Более того, нанесение раны на целевой участок с использованием смешанного использования тиольного соединения, концентрата *Agrobacterium* и разрушения ультразвуком привело к положительному улучшению эффективности трансформации (Meurer et al., 1998, *Plant Cell Rep.*, Vol. 18, 180-186; Olhofs et al., 2003, *Planta*, Vol. 216, 723-735; Kim et al., 2013, *Plant Biotechnol Rep.*, Vol. 7, 425-433; Kim et al., 2016, *Plant Biotechnol Rep.*, Vol. 10, 257-267).

Соя содержит приблизительно 20% жира в общем составе, а жир состоит из жирных кислот. Жирные кислоты состоят из насыщенных жирных кислот и ненасыщенных жирных кислот. Ненасыщенные жирные кислоты состоят из олеиновой кислоты, линолевой кислоты и α -линоленовой кислоты. Среди них α -линоленовая кислота представляет собой растительную омега-3 жирную кислоту, которая, как известно, ингибирует рост раковых клеток, предотвращает сердечно-сосудистые заболевания, тормозит воспаление и свертываемость крови и расщепляет жир. Линолевая кислота представляет собой омега-6 жирную кислоту, которая, как известно, стимулирует рост раковых клеток, снижает кровяное давление, вызывает воспаление и тромбоз и способствует накоплению жира в отличие от α -линоленовой кислоты.

Сообщалось, что низкое соотношение омега-6/омега-3 в жирах приводит к торможению развития вышеупомянутых заболеваний. В ряде примеров, если соотношение составляет 4:1, то профилактика сердечно-сосудистых заболеваний может быть превосходной, и кровообращение может улучшаться, если соотношение составляет 2-3:1, а воспаление при ревматоидном артрите может тормозиться, при этом известно, что идеальное соотношение составляет 2-1:1. Соевое масло содержит 54% омега-6 жирных кислот и 8% омега-3 жирных кислот, а соотношение двух жирных кислот является очень высоким 6-7:1.

В метаболизме ненасыщенных жирных кислот сои было известно, что ген FAD2 служит для превращения олеиновой кислоты в линолевую кислоту, а ген FAD3 служит для превращения линолевой кислоты в α -линоленовую кислоту. Сообщалось об изменениях содержания олеиновой и линолевой кислот в метаболизме жирных кислот в результате мутации гена FAD2. Когда происходит мутация в гене FAD2, содержание олеиновой кислоты увеличивается, а содержание линолевой кислоты уменьшается, поэтому соотношение линолевой кислоты и α -линоленовой кислоте корректируется, но при этом существует ограничение в определении удовлетворительного соотношения 4:1 или меньше. Следовательно, необходимо контролировать содержание олеиновой кислоты и линолевой кислоты.

Специфические ненасыщенные жирные кислоты.

В одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения может быть представлен растительный организм с повышенным содержанием специфической ненасыщенной жирной кислоты или переработанный продукт с его использованием.

В данном случае специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой C8-24:D1 ненасыщенную жирную кислоту.

Специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой C16-22:D1 ненасыщенную жирную кислоту.

Специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой C18:D1 ненасыщенную жирную кислоту.

Специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой олеиновую кислоту.

В качестве альтернативы специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой ненасыщенную жирную кислоту, полученную путем удаления одной двойной связи из C8-24:D2 нена-

сыщенной жирной кислоты, специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой ненасыщенную жирную кислоту, полученную путем удаления одной двойной связи из C16-22:D2 ненасыщенной жирной кислоты, специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой ненасыщенную жирную кислоту, полученную путем удаления одной двойной связи из C18:D2 ненасыщенной жирной кислоты, и специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой ненасыщенную жирную кислоту, полученную путем удаления одной двойной связи из линолевой кислоты.

Другой типичный вариант осуществления настоящего изобретения относится к растительному организму со сниженным содержанием специфической ненасыщенной жирной кислоты или к переработанному продукту, полученному с его использованием.

В данном случае специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой C8-24:D2 ненасыщенную жирную кислоту.

Специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой C16-22:D2 ненасыщенную жирную кислоту.

Специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой C18:D2 ненасыщенную жирную кислоту.

Специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой линолеовую кислоту.

В качестве альтернативы специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой ненасыщенную жирную кислоту, полученную путем образования одной двойной связи в C8-24:D1 ненасыщенной жирной кислоте, специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой ненасыщенную жирную кислоту, полученную путем образования одной двойной связи в C16-22:D1 ненасыщенной жирной кислоте, специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой ненасыщенную жирную кислоту, полученную путем образования одной двойной связи в C18:D1 ненасыщенной жирной кислоте, и специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой ненасыщенную жирную кислоту, полученную путем образования одной двойной связи в олеиновой кислоте.

В качестве альтернативы специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой ненасыщенную жирную кислоту, полученную путем удаления одной двойной связи из C8-24:D3 ненасыщенной жирной кислоты, специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой ненасыщенную жирную кислоту, полученную путем удаления одной двойной связи из C16-22:D3 ненасыщенной жирной кислоты, специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой ненасыщенную жирную кислоту, полученную путем удаления одной двойной связи из C18:D3 ненасыщенной жирной кислоты, и специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой ненасыщенную жирную кислоту, полученную путем удаления одной двойной связи из α -линоленовой кислоты.

В одном варианте осуществления специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой C18:D1 ненасыщенную жирную кислоту или C18:D2 ненасыщенную жирную кислоту.

В другом варианте осуществления специфическая ненасыщенная жирная кислота может представлять собой олеиновую кислоту или линолеовую кислоту.

В другом иллюстративном варианте осуществления настоящее изобретение может относиться к применению системы для контроля дополнительного третьего механизма в организме, который вовлечен в различные функции специфического фактора, функция которого подвергнута искусственной модификации (например, гена, известного как ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор).

Например, специфический фактор, функция которого подвергнута искусственной модификации, может представлять собой один или более генов, выбранных из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8.

Третий механизм может представлять собой механизм в растительном организме, отличный от биосинтеза ненасыщенной жирной кислоты, вовлеченный в эти гены.

Композиция, предназначенная для контроля ненасыщенной жирной кислоты.

Один типичный вариант осуществления настоящего изобретения относится к композиции, используемой для контроля содержания ненасыщенной жирной кислоты в растении с использованием ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, подвергнутого искусственной манипуляции.

Композиция может содержать ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, подвергнутый искусственной манипуляции, или композицию, предназначенную для манипуляции, которая способна подвергать искусственной манипуляции ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор.

В одном иллюстративном варианте осуществления композиция может содержать ассоциированный с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор, то есть ген и/или белок.

В одном иллюстративном варианте осуществления композиция может включать композицию, предназначенную для манипуляции, которая может подвергать искусственной манипуляции ассоцииро-

ванных с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактор.

Композиция, предназначенная для манипуляции, может содержать комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

Композиция, предназначенная для манипуляции, может включать направляющую нуклеиновую кислоту и/или редактирующий белок.

Композиция, предназначенная для манипуляции, может включать нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую нуклеиновую кислоту и/или редактирующий белок.

Композиция, предназначенная для манипуляции, может включать вирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую нуклеиновую кислоту и/или редактирующий белок.

В другом иллюстративном варианте осуществления композиция может дополнительно включать дополнительный элемент.

Дополнительный фактор может включать подходящий носитель для его переноса в растительный организм субъекта.

В иллюстративном варианте осуществления композиция может включать продукт экспрессии ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, который подвергают манипуляции с достижением такого количества, которое достаточно для повышения или снижения содержания специфической ненасыщенной жирной кислоты.

Термин "количество, достаточное для повышения или снижения содержания специфической ненасыщенной жирной кислоты" означает эффективное количество, необходимое для повышения или снижения содержания специфической ненасыщенной жирной кислоты.

В одном иллюстративном варианте осуществления настоящее изобретение может относиться к следующим композициям, предназначенным для контроля ненасыщенной жирной кислоты:

к композиции, предназначенной для контроля содержания специфической ненасыщенной жирной кислоты, которая включает направляющую нуклеиновую кислоту, способную образовывать комплементарную связь независимо с одной или несколькими целевыми последовательностями в последовательности нуклеиновой кислоты одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8, или кодирующей его последовательности нуклеиновой кислоты, и

к редактирующему белку или кодирующей его последовательности нуклеиновой кислоты;

к композиции, предназначенной для контроля содержания специфической ненасыщенной жирной кислоты, которая включает направляющую нуклеиновую кислоту, способную образовывать комплементарную связь независимо с целевой последовательностью одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8, или кодирующей его последовательности нуклеиновой кислоты, и

к редактирующему белку или кодирующей его последовательности нуклеиновой кислоты; и

к композиции, предназначенной для контроля содержания специфической ненасыщенной жирной кислоты, которая включает комплекс, образованный направляющей нуклеиновой кислотой, способной независимо образовывать комплементарную связь с целевой последовательностью одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8, или кодирующей его последовательности нуклеиновой кислоты и редактирующему белку.

В данном случае направляющая нуклеиновая кислота или кодирующая ее последовательность нуклеиновой кислоты и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая редактирующий белок, могут присутствовать в форме одного или более векторов. Они могут присутствовать в форме гомологичного или гетерологичного вектора.

Способ контроля ненасыщенной жирной кислоты.

В другом иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению в настоящем изобретении представлен способ контроля содержания ненасыщенной жирной кислоты, который предусматривает получение вышеописанной композиции и введение эффективного количества композиции в целевой растительный организм.

Манипуляция с геном.

Может быть использован способ контроля содержания ненасыщенной жирной кислоты путем осуществления манипуляции с геном организма. Такой способ контроля может предусматривать введение композиции, предназначенной для генетической манипуляции, в растительный организм с целью осуществления манипуляции с геном растительного организма.

Композиция, предназначенная для генетической манипуляции, может содержать комплекс направляющая нуклеиновая кислота - редактирующий белок.

Композиция, предназначенная для генетической манипуляции, может быть введена в определенный тип растения.

В данном случае определенный тип растения может представлять собой семя, но при этом настоящее изобретение не ограничивается им.

В одном аспекте настоящее изобретение может относиться к способу модификации целевого полинуклеотида в клетках растения.

В одном иллюстративном варианте осуществления способ предусматривает получение клеток или популяции клеток из растения в качестве образца и модификацию клеток или популяции клеток. Культивирование может быть выполнено на любой стадии вне растительного организма. Клетку или клетки можно повторно вводить в растение.

Кроме того, в другом иллюстративном варианте осуществления настоящее изобретение может относиться к способу искусственной манипуляции с клетками, который предусматривает:

введение (а) направляющей нуклеиновой кислоты, способной образовывать комплементарную связь с каждой из целевых последовательностей одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8, или кодирующей его последовательности нуклеиновой кислоты; и

(b) редактирующего белка, включающего один или более белков, выбранных из группы, состоящей из белка Cas9, полученного из *Streptococcus pyogenes*, белка Cas9, полученного из *Campylobacter jejuni*, белка Cas9, полученного из *Streptococcus thermophilus*, белка Cas9, полученного из *Staphylococcus aureus*, белка Cas9, полученного из *Neisseria meningitidis*, и белка Cpf1, или кодирующей его последовательности нуклеиновой кислоты, в растительные клетки.

Направляющая нуклеиновая кислота и редактирующий белок могут присутствовать в одном или более векторах в форме последовательности нуклеиновой кислоты или в комплексе комбинации направляющей нуклеиновой кислоты и редактирующего белка.

К методике вышеописанного раздела "7. Доставка" можно обращаться перед стадией введения.

Например, стадия введения может осуществляться с помощью одного или более способов, выбранных из генной пушки, электропорации, липосом, плазмид, вирусных векторов, наночастиц и способа слияния белка с доменом транслокации белка (PTD).

Например, вирусный вектор может представлять собой один или более, выбранный из группы, состоящей из вируса мозаики, ретровируса, лентивируса, аденовируса, аденоассоциированного вируса (AAV), вируса осповакцины, поксвируса и вируса простого герпеса.

Например, вектор может быть включен в агробактерии, а затем введен.

Если осуществляют искусственную манипуляцию с ассоциированным с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактором с использованием способов и композиций в соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления по настоящему изобретению, то можно контролировать тип и/или содержание ненасыщенной жирной кислоты, например, повышать или снижать содержание специфической ненасыщенной жирной кислоты и/или изменять содержание специфической ненасыщенной жирной кислоты, а значит может быть получено растение, в котором содержание ненасыщенной жирной кислоты, полезной для здоровья человека, повышается, или содержание вредной ненасыщенной жирной кислоты снижается, и/или его переработанный продукт (пищевой продукт и т.д.).

Дополнительные варианты применения.

В любом иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению может быть представлен набор для получения композиции, предназначенной для контроля содержания ненасыщенной жирной кислоты, который включает композицию.

Набор может быть получен с помощью традиционного способа получения, известного из уровня техники.

Набор может дополнительно включать выявляемую метку. Термин "выявляемая метка" относится к атому или молекуле, предназначенных для специфического выявления молекулы, содержащей метку, среди одинакового типа молекул без метки. Выявляемая метка может быть присоединена к антителу, специфически связывающемуся с белком или его фрагментом, к белку взаимодействия, лиганду, наночастицам или аптамеру. Выявляемая метка может включать радионуклид, флуорофор и фермент.

В любом иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению может быть представлен способ скрининга материала, способного контролировать уровень экспрессии одного или более генов, выбранных из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8, которые подвергаются искусственной манипуляции.

В любом иллюстративном варианте осуществления по настоящему изобретению может быть представлен способ обеспечения информации о последовательности в подвергнутом искусственной манипуляции целевом положении в субъекте путем анализа последовательности одного или более генов, выбранных из группы, состоящей из гена FAD2, гена FAD3, гена FAD6, гена FAD7 и гена FAD8.

Кроме того, в настоящем изобретении представлен способ конструирования библиотеки с использованием предоставленной информации.

В данном случае может быть использована известная база данных.

В конкретных иллюстративных вариантах осуществления по настоящему изобретению может быть представлено растение или клетки, которые могут быть использованы для исследования с использованием способа по настоящему изобретению.

Растение или клетки, которые включают отредактированные хромосомы в одной или более последовательностях нуклеиновой кислоты, ассоциированных с биосинтезом ненасыщенной жирной кислоты, могут быть получены с использованием способа по настоящему изобретению. Последовательность нук-

леиновой кислоты может представлять собой последовательность, которая может кодировать последовательность белка, ассоциированную с биосинтезом ненасыщенной жирной кислоты, или эталонную последовательность, ассоциированную с биосинтезом ненасыщенной жирной кислоты.

В одном иллюстративном варианте осуществления эффект мутации и механизм биосинтеза ненасыщенной жирной кислоты могут быть изучены в растении или клетках с использованием измерения, обычно используемого в исследовании, связанном с биосинтезом ненасыщенной жирной кислоты с использованием растения или клеток, полученных с помощью способа по настоящему изобретению. В качестве альтернативы эффект активного соединения в отношении биосинтеза ненасыщенной жирной кислоты можно исследовать с использованием растения или клеток.

В другом иллюстративном варианте осуществления эффект доступной стратегии манипуляции с геном может быть оценен с использованием растения или клеток, полученных с помощью способа по настоящему изобретению. Другими словами, путем модификации хромосомной последовательности, кодирующей белок, ассоциированный с биосинтезом ненасыщенной жирной кислоты, можно стимулировать или ингибировать биосинтез соответствующей ненасыщенной жирной кислоты. В частности, этот способ предусматривает создание модифицированного белка путем редактирования хромосомной последовательности, кодирующей белок, связанный с биосинтезом ненасыщенной жирной кислоты, что приводит к модификации растения или клеток. Следовательно, в некоторых типичных вариантах осуществления результат применения генетически модифицированного растения может быть оценен путем сравнения механизма биосинтеза ненасыщенной жирной кислоты с таковым у дикого типа.

Генетически модифицированное растение может быть использовано для получения растительного организма с повышенным или сниженным содержанием специфических ненасыщенных жирных кислот с помощью ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора и системы, предназначенной для контроля ненасыщенной жирной кислоты, функция которого таким образом искусственно модифицирована. Посредством контроля различных механизмов, вовлеченных в ряд ассоциированных с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот факторов, может быть улучшена система, предназначенная для контроля ненасыщенной жирной кислоты.

Примеры

Далее настоящее изобретение будет описано в дополнительных подробностях со ссылкой на примеры.

Данные примеры представлены исключительно для описания настоящего изобретения в дополнительных подробностях, и специалистам в данной области техники будет понятно, что объем настоящего изобретения не ограничивается следующими примерами.

Экспериментальные способы.

1. Конструирование gRNA.

Целевой сайт CRISPR/Cas9 гена FAD2 сои отбирали с использованием средств CRISPR RGEN (Научно-исследовательский институт естественных наук, Южная Корея). Целевой сайт каждого гена может отличаться в соответствии с типом фермента CRISPR, и целевая последовательность гена для SpCas9 кратко описана в приведенной выше табл. 1.

2. Конструкция вектора для трансформации сои.

В тесте с трансформацией сои использовали вектор pPZP, включающий gRNA из FAD2-7 или FAD2-30, для нацеливания на ген FAD2, при этом вектор также включал Cas9. Штамм EHA105 *Agrobacterium tumefaciens* трансформировали сконструированными векторами pPZP-FAD2-7 и pPZP-FAD2-30 (фиг. 1).

3. Трансформанты сои и получение семян T₁.

1) Стерилизация и замачивание семян.

Семена стерилизовали с помощью газообразной хлористоводородной кислоты, полученной путем смешивания хлорсодержащего отбеливателя (100 мл 12% гипохлорита натрия) с концентрированной хлористоводородной кислотой (12 н HCl, 5 мл) в течение 20 ч, выдерживали в 1% суспензии гипохлорита натрия в течение 10 мин для дополнительной стерилизации и промывали стерильной водой три раза с интервалом 10 мин. Каждое из стерильных семян помещали в 50-мл коническую пробирку, а затем наливали стерильную воду в коническую пробирку для осуществления замачивания при комнатной температуре в течение 20 ч.

2) Получение инокулята (*Agrobacterium tumefaciens*).

В тесте с трансформацией сои использовали векторы pPZP-FAD2-7 и pPZP-FAD2-30, сконструированные в штамме *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 и включали PPT^R. Бактериальный штамм, содержащий вектор, высевали штрихом на твердую среду YEP [75 мг/л стрептомицина, 25 мг/л рифампицина, 10 г/л пептона, 5 г/л NaCl, 5 г/л дрожжевого экстракта, 1,5 вес./об.% агара (pH 7,0)] и культивировали при 28°C с получением тем самым отдельной колонии. Колонию суспендировали в 10 мл жидкой среды YEP, содержащей те же антибиотики, содержащиеся в твердой среде YEP, и взбалтывали при 220 об/мин при 28°C до достижения OD₆₅₀ 0,6-0,8. Добавляли 10 мл 30% маточного раствора глицерина и смешивали с полностью выросшими бактериальными клетками, 1 мл клеточной суспензии вносили в каждую 1,5-мл пробирку, быстро охлаждали жидким азотом и хранили при -70°C. За день перед инокуляцией добавляли

1 мл маточной культуры *Agrobacterium tumefaciens*, которую хранили при -70°C , в 200 мл жидкой среды YEP, содержащей антибиотик, и культивировали со встряхиванием в термостате при 250 об/мин при 25°C до достижения OD_{650} 0,6-0,8. Через день после инокуляции 200 мл жидкой среды YEP разделяли по 50 мл и центрифугировали при 20°C и 3270 g в течение 10 мин. Добавляли 15 мл жидкой среды для совместного культивирования (CCM; 0,32 г/л соли B5, 1,67 мг/л BA, 20 mM MES, 0,25 мг/л GA_3 , 0,2 mM ацетосирингона, 3,3 mM L-цистеина, 1,0 mM тиосульфата натрия, 1,0 mM DTT, 3% сахарозы, pH 5,4) к клеточному осадку *Agrobacterium tumefaciens* в каждой пробирке.

3) Инокуляция и совместное культивирование.

Затем замоченное семя вертикально разрезали до гипокотили скальпелем, вставленным между двумя семядолями, а оболочку семени удаляли. Ось эмбриона разрезали примерно на 1 см ниже семядоли и одну сторону, к которой была присоединена ось эмбриона, надсекали 7-8 раз скальпелем (лезвие № 11). В данном случае скальпель покрывали 15 мл концентрата и рану наносили в целевом участке. Приблизительно 50 эксплантатов помещали в 15 мл совместной культуры с *Agrobacterium tumefaciens* и обрабатывали ультразвуком в течение 20 с, а затем инокулировали в течение 30 мин. После извлечения каждого эксплантата из пробирки и помещения на фильтровальную бумагу для удаления влаги лист фильтровальной бумаги помещали на твердую CCM (такую же, как жидкая CCM, агар (0,7%)), а затем на ней размещали 10 эксплантатов (размещали адаксиальной стороной вниз). Планшет закрывали лентой из микропористого материала и совместно культивировали с фотопериодичностью в течение 18 ч при 25°C в течение 5 суток.

4) Промывание и индуцирование побегообразования.

Через пять суток после совместного культивирования эксплантаты кратковременно промывали жидкой средой для индуцирования прорастания 1/2 (SIM) в течение 10 мин для стерилизации. Эксплантаты помещали на фильтровальную бумагу для удаления влаги, а затем по шесть эксплантатов на планшет укладывали в планшеты, содержащие селективную SI-1 без антибиотиков (индуцирующую прорастание среду; 3,2 г/л соли B5, 1,67 мг/л BA, 3 mM MES, 0,8% агара, 3% сахарозы, 250 мг/л цефотаксима, 50 мг/л ванкомицина, 100 мг/л тикарциллина, pH 5,6), и регенерирующую часть эксплантата располагали стороной вверх под углом приблизительно 30° . Каждый планшет закрывали лентой из микропористого материала и культивировали с фотопериодичностью при 25°C в течение 18 ч.

Через две недели проросшие эксплантаты укладывали на 10 мг/л селективной содержащей антибиотик PPT SI-2 (такой же, как и SI-1 , с добавлением 10 мг/л DL-фосфинотрицина, pH 5,6), а другую часть, кроме проростка, удаляли и укладывали так, что адаксиальная часть была обращена вниз.

5) Удлинение побега.

Через две недели подложку для проращивания с коричневыми проростками разрезали скальпелем (лезвие № 15) и укладывали на 5 мг/л селективной содержащей антибиотик PPT среды для удлинения побега (SEM; 4,4 г/л соли MS, 3 mM MES, 0,5 мг/л GA_3 , 50 мг/л аспарагина, 100 мг/л пироглутаминовой кислоты, 0,1 мг/л IAA, 1 мг/л зеатина, 3% сахарозы, 0,6% агара, 250 мг/л цефотаксима, 50 мг/л ванкомицина, 100 мг/л тикарциллина, 5 мг/л DL-фосфинотрицина, pH 5,6). Каждые две недели подложку для проращивания с побегами переносили на свежую SEM, коричневую часть побега удаляли с использованием верхней стороны скальпеля (лезвие № 15) и подложку для проращивания постепенно выскабливали для того, чтобы среда хорошо впитывалась. Когда побег подрастал до крышки чашки Петри, две чашки Петри (100 мм×40 мм) складывали так, чтобы побег дорастал до приблизительно 8 см. Каждую чашку закрывали лентой из микропористого материала и инкубировали с фотопериодичностью при 25°C в течение 18 ч.

6) Укоренение, акклиматизация и окрашивание листьев с помощью PPT.

Когда длина побега при отборе на SEM составляла 4 см или больше, проросток вырезали скальпелем (лезвие № 11) и переносили на среду для укоренения (RM; 4,4 г/л соли MS, 3 mM MES, 3% сахарозы, 0,8% агара, 50 мг/л цефотаксима, 50 мг/л ванкомицина, 50 мг/л тикарциллина, 25 мг/л аспарагина, 25 мг/л пироглутаминовой кислоты, pH 5,6). В данном случае нижнюю часть удлиненного побега, отделенную разрезанием, погружали в 1 мг/мл IBA на три минуты, а затем помещали в тестовую пробирку, содержащую RM.

Когда корень отрастал в достаточной степени, среду вымывали из корня трижды дистиллированной водой. Выросший корень пересаживали в небольшой горшок (6 см×6 см×5,6 см), содержащий смесь почвы (Bio Plug № 2, Heungnong seeding) и вермикулита (2:1), и помещали в бокс Magenda. Приблизительно через 10 суток на поверхность листа наносили раствор 100 мг/л DL-фосфинотрицина.

7) Получение семян T_1 .

Когда растительный организм вырастал в достаточной степени, то его пересаживали в больший горшок и накрывали прозрачным пластиковым колпаком с приблизительно 10 порами. Через 10 суток растительный организм обрабатывали с помощью Basta® (BAYER, 53 мг/л). В результате организмы, не являющиеся трансформантами (*Glycine max* L. Kwangan, NT), чутко реагировали и таким образом слабели, а трансформанты не проявляли каких-либо изменений и демонстрировали устойчивость. Девять соевых трансформантов (восемь pPZP-FAD2-7 и один pPZP-FAD2-30), демонстрирующих устойчивость,

переносили в теплицу, в результате чего получали семена T₁.

8) Удаление введенного в трансформант T₁ гена и получение семян T₂.

Для подтверждения того, что ген, введенный в трансгенный растительный организм T₁, был удален, высевали семена T₁ и в небольшом горшке выращивали растительный организм до 15 см или больше с 9 или больше листьями, с последующим осуществлением окрашивания листьев фосфинотрицином. Отобранный трансгенный растительный организм переносили в больший горшок (20 см (диаметр)×25 см (высота)) и выращивали в теплице для получения образца T₁ и получения семян T₂.

4. Анализ переноса генов.

Отвешивали 1 г листьев временных трансформантов, замораживали жидким азотом и замороженные листья хорошо измельчали в ступке, а затем экстрагировали геномную ДНК с использованием способа СТАВ. Для определения того, что ген был введен, проводили ПЦР с использованием последовательностей gRNA FAD2-7 и FAD2-30, селективируемого гена Bar и гена Cas9. Для подтверждения введения генов FAD2-7 и FAD2-30 использовали следующие праймеры.

В случае гена FAD2-7 использовали прямой праймер для промотора AtU6p (5'-GAATGATTAGGCATCGAACCC-3' (SEQ ID NO: 31)) и обратный праймер FAD2-7 (5'-AAACTCCTCAAGGGTTCCAAACAC-3' (SEQ ID NO: 31)).

В случае гена FAD2-30 использовали прямой праймер (5'-GAATGATTAGGCATCGAACCC-3' (SEQ ID NO: 31)) для промотора AtU6p и обратный праймер (5'-AAACTCCTCAAGGGTTCCAAACACC-3' (SEQ ID NO: 33)) FAD2-7. Для подтверждения введения гена Bar использовали прямой праймер Bar (5'-TCCGTACCGAGCCGCAGGAA-3' (SEQ ID NO: 34)) и обратный праймер Bar (5'-CCGGCAGGCTGAAGTCCAGC-3' (SEQ ID NO: 35)).

Кроме того, для подтверждения введения Cas9 проводили ПЦР с использованием следующих трех наборов праймеров:

набор с прямым праймером Cas9-① (5'-ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGC-3' (SEQ ID NO: 36)) и обратным праймером Cas9-① (5'-AACTTGTAGAACTCCTCCTGGCTG-3' (SEQ ID NO: 37));

набор с прямым праймером Cas9-② (5'-TTCAGGAAGTCCAGGATGGTCTTG-3' (SEQ ID NO: 38)) и обратным праймером Cas9-② (5'-AGAAGTGGAAAGTCCTTGCGGAAGT-3' (SEQ ID NO: 39));

а также набор с прямым праймером Cas9-③ (5'-CTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGG-3' (SEQ ID NO: 40)) и обратным праймером Cas9-③ (5'-TTAGGCGTAGTCGGGCACGTCGA-3' (SEQ ID NO: 41)).

5. Анализ удаления гена.

Отвешивали 1 г листьев трансгенного растительного организма T₁ и замораживали жидким азотом и замороженные листья хорошо измельчали в ступке. Помещали 0,5 г измельченных листьев в 2-мл пробирку, добавляли 1 мл раствора, полученного путем смешивания цетилтриметиламмониевого буфера (сТАВ) и β-меркаптоэтанола (2-МЕ) в соотношении 20:1 и обрабатывали в нагревательном блоке при 65°C в течение 1 ч, а затем добавляли 10 мкл РНКазы (1,5 мг/150 мкл H₂O) для обеспечения инкубации при 37°C в течение 1 ч. Через один час смешивали хлороформ с изоамиловым спиртом (24:1) в таком же объеме и хорошо перемешивали с получением реагента, а затем центрифугировали при 4°C и 12000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и снова обрабатывали реагентом хлороформ:изоамиловый спирт (24:1). После добавления надосадочной жидкости к такому же объему изопропанола и смешивания путем переворачивания 3-4 раза помещали в холодильник с -20°C на 1 ч и центрифугировали при 4°C и 12000 об/мин в течение 10 мин. После отбрасывания надосадочной жидкости добавляли 1 мл 70% этанола и полученный раствор снова центрифугировали в течение 2 мин с получением таким образом клеточного осадка. После отбрасывания надосадочной жидкости клеточный осадок сушили при комнатной температуре в течение 20 мин, а затем суспендировали в 30 мкл дистиллированной воды для экстрагирования геномной ДНК. Экстрагированную геномную ДНК разбавляли в 20 раз и использовали в качестве матрицы.

Последовательности оснований введенного гена и селективируемого гена устойчивости к антибиотикам BAR подвергали 35 циклам ПЦР, состоящим из предварительной денатурации при 95°C в течение 10 мин, денатурации при 95°C в течение 30 с, отжига при 55-65°C в течение 30 с и достройки при 72°C в течение 30 с -1,5 мин, дополнительно подвергали достройке при 72°C в течение 10 мин, и результат определяли с использованием набора для ПЦР (Prime Taq Premix, GENETBIO, Корея).

6. Анализ содержания олеиновой кислоты.

Для анализа жирных кислот три семени сои, полученные от каждого трансформанта, анализировали отдельно. Каждое семя помещали в бумажный пакет, раздавливали с использованием молотка и жирную кислоту экстрагировали с использованием 5 мл растворителя для экстракции (хлороформ:гексан:метанол, 8:5:2) при комнатной температуре в течение 12 ч. 150 мкл экстрагированной жирной кислоты переносили во флакон, добавляли 75 мкл реагента для метилирования (0,25 М метанольный метоксид натрия:петролейный эфир:этиловый эфир, 1:5:2), а затем добавляли гексан до 1 мл. Вводили 1

мкл образца и анализировали с использованием устройства для газовой хроматографии (GC, Agilent Technologies, USA), при этом условия для анализа показаны в табл. 2 ниже. Соотношение жирной кислоты вычисляли по площади каждой жирной кислоты в отношении к общей площади жирных кислот.

Таблица 2

Условия GC для анализа жирных кислот в сое

Пункт	Условие
Инструмент	Agilent 7890A
Колонка	0,25 мкм (внутренний диаметр) × 30 м капиллярная колонка DB-FFAP
Детектор	Пламенно-ионизационный детектор
Температура печи	230°C
Температура введения	210°C
Температура детектора	250°C
Газ-носитель	N ₂ (1,5 мл/минута)
Объем введения	1 мкл

7. Анализ последовательности гена FAD2.

Проводили ПЦР-амплификацию целевого участка размером 200-300 п.о. с использованием ДНК-полимеразы HiFi Plus (EpiBio). ПЦР-продукт, полученный вышеописанным способом, подвергали секвенированию с использованием системы MiSeq (Illumina), а затем анализировали с использованием анализатора Cas, инструмента CRISPR RGEN (www.rgenome.net).

Пример 1. Вектор для трансформации и получение трансформанта.

Для нокаута гена FAD2, как показано в табл. 1, разрабатывали направляющую РНК, нацеливающуюся на ген FAD2, и клонировали с белком Cas9 в вектор pPZP с конструированием таким образом вектора для трансформации сои (фиг. 1). Как показано на фиг. 2, с помощью процесса регенерации растения получили общей сложностью 9 трансформантов (Т₀) (восемь pPZP-FAD2-7 8 и один pPZP-FAD2-30) (фиг. 3). Семена Т₁ собирали с трансформантов Т₀ с получением таким образом трансформантов Т₁ (фиг. 10).

Пример 2. ПЦР-анализ для определения переноса гена в трансформант.

Выделяли ДНК из FAD2-7 и FAD2-30 трансформантов Т₀ и проводили ПЦР в соответствии с вышеописанным способом, подтверждающим полное введение вводимых направляющей РНК, FAD2-7 и FAD2-30 и селективируемого гена Bar и Cas9 (фиг. 4).

Пример 3. Анализ содержания олеиновой кислоты в трансгенной сое.

Содержания олеиновой кислоты анализировали в FAD2-7 и FAD2-30 семенах Т₁ в соответствии с вышеописанным способом. Содержания олеиновой кислоты в FAD2-7 и FAD2-30 семенах Т₁ были значительно выше, чем в семенах дикого типа, таких как Glycine max L. Pungsan, Glycine max L. Kwangan и Glycine max L. Hosim (фиг. 5).

Пример 4. Анализ последовательности гена FAD2 в трансгенной сое.

Частоту инсерционно-делеционных мутаций (фиг. 6) и последовательности (фиг. 7) анализировали для подтверждения индуцирования мутации в генах FAD2 FAD2-7 и FAD2-30 семян Т₁ в соответствии с вышеописанным способом. Подтвердили, что произошло индуцирование мутации в FAD2-7 семени Т₁.

Кроме того, трансформанты Т₁ анализировали с помощью глубокого секвенированием для подтверждения индуцирования мутации в гене FAD2. В результате подтвердили, что мутация индуцирована в целевом сайте гена FAD2 в хромосоме № 10 (chr10) и хромосоме №20 (chr20) других трансформантов Т₁ за исключением FAD2-7 № 1-1 и FAD2-30 № 2-4, № 9-1 и № 3-1 (фиг. 8 и 9).

Пример 5. Анализ удаления введенного гена трансгенной сои.

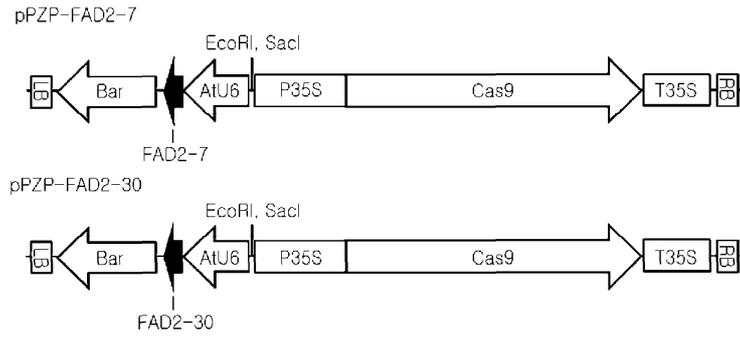
Для подтверждения удаления гена из отобранных трансформантов Т₁ проводили ПЦР для селективируемого гена BAR и гена, введенного в составе вводимого вектора. В результате подтвердили, что из одного FAD2-7 Т₁ трансформанта удалены оба введенных гена и ген BAR, а из пятнадцати FAD2-30 Т₁ трансформантов у индивидуумов (9-1, 19-1, 21-1, 21-5) подтвердили частичное удаление генов (фиг. 11).

Промышленная применимость

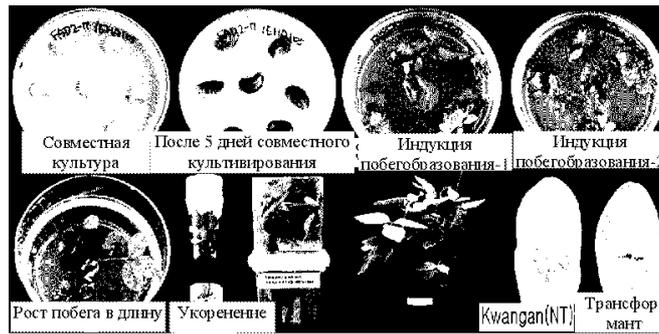
Переработанный продукт может быть изготовлен с использованием растительного организма с повышенным содержанием специфической ненасыщенной жирной кислоты, которая полезна для здоровья человека, или со сниженным содержанием специфической ненасыщенной жирной кислоты, которая вредна для здоровья человека, с использованием ассоциированного с биосинтезом ненасыщенных жирных кислот фактора, подвергнутого искусственной манипуляции, и системы, предназначенной для контроля ненасыщенной жирной кислоты, который таким образом является искусственно модифицированным и может быть использован для продукта питания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

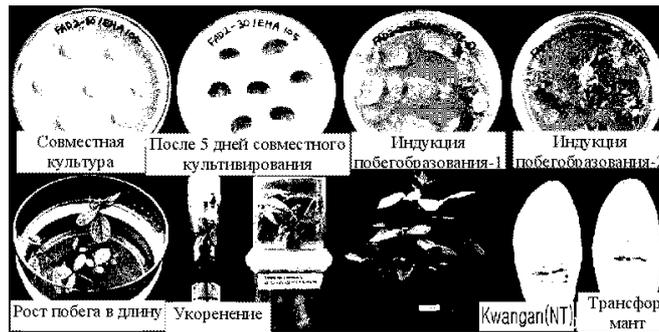
1. Растение, содержащее подвергнутый искусственной манипуляции геном, где подвергнутый искусственной манипуляции геном содержит подвергнутый манипуляции ген FAD2, в котором индуцирована инсерционно-делеционная мутация в последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-30, посредством системы CRISPR/Cas, где последовательность, выбранная из SEQ ID NO: 1-30, содержит последовательность PAM 5'-NGG-3', где N независимо представляет собой A, T, C или G, где подвергнутый манипуляции ген FAD2 способен к нокауту гена FAD2 дикого типа, таким образом ингибируя экспрессию гена FAD2 дикого типа в растении, где растение, содержащее подвергнутый искусственной манипуляции геном, в сравнении с растением дикого типа характеризуется по меньшей мере одним фенотипом, выбранным из группы, состоящей из:
 - (a) сниженной экспрессии белка FAD2;
 - (b) сниженного количества РНК-транскриптов гена FAD2;
 - (c) повышенного содержания C8-24:D1 ненасыщенной жирной кислоты и
 - (d) сниженного содержания C8-24:D2 ненасыщенной жирной кислоты.
2. Растение по п.1, где C8-24:D1 ненасыщенная жирная кислота представляет собой C16-22:D1 ненасыщенную жирную кислоту.
3. Растение по п.1, где C8-24:D1 ненасыщенная жирная кислота представляет собой C18:D1 ненасыщенную жирную кислоту.
4. Растение по п.1, где C8-24:D2 ненасыщенная жирная кислота представляет собой C16-22:D2 ненасыщенную жирную кислоту.
5. Растение по п.1, где C8-24:D2 ненасыщенная жирная кислота представляет собой C18:D2 ненасыщенную жирную кислоту.
6. Растение по п.1, где растение представляет собой сою.
7. Композиция для получения растения, содержащего подвергнутый искусственной манипуляции геном, которая содержит:
 - направляющую нуклеиновую кислоту, способную нацеливаться на ген FAD2, или кодирующую ее последовательность нуклеиновой кислоты и
 - редактирующий белок или кодирующую его последовательность нуклеиновой кислоты, где редактирующий белок представляет собой белок Cas9, полученный из *Streptococcus pyogenes*, где направляющая нуклеиновая кислота представляет собой последовательность РНК, способную связывать целевой участок в пределах последовательности нуклеиновой кислоты гена FAD2, где целевой участок гена содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-30.
8. Композиция по п.7, где композиция, предназначенная для манипуляции с геном, составлена в векторной системе на основе *Agrobacterium*.
9. Композиция по п.7, где композиция, предназначенная для манипуляции с геном, составлена в вирусной векторной системе.
10. Композиция по п.9, где вирусный вектор включает один или более вирусных векторов, выбранных из вируса мозаики, ретровируса, лентивируса, аденовируса, аденоассоциированного вируса (AAV), вируса осповакцины, поксвируса и вируса простого герпеса.
11. Способ получения растения, содержащего подвергнутый искусственной манипуляции геном, по п.1, предусматривающий доставку композиции субъекту, где субъект представляет собой растительную клетку, семя, часть растительного организма или целый растительный организм, где композиция содержит:
 - направляющую нуклеиновую кислоту, способную нацеливаться на ген FAD2, или кодирующую ее последовательность нуклеиновой кислоты и
 - редактирующий белок или кодирующую его последовательность нуклеиновой кислоты, где редактирующий белок представляет собой белок Cas9, полученный из *Streptococcus pyogenes*, где направляющая нуклеиновая кислота представляет собой последовательность РНК, способную связывать целевой участок в пределах последовательности нуклеиновой кислоты гена FAD2, где целевой участок гена содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-30.
12. Способ по п.11, где композиция составлена в векторной системе на основе *Agrobacterium*.
13. Способ по п.11, где композиция составлена в вирусной векторной системе.
14. Способ по п.13, где вирусный вектор включает один или более вирусных векторов, выбранных из вируса мозаики, ретровируса, лентивируса, аденовируса, аденоассоциированного вируса (AAV), вируса осповакцины, поксвируса и вируса простого герпеса.



Фиг. 1

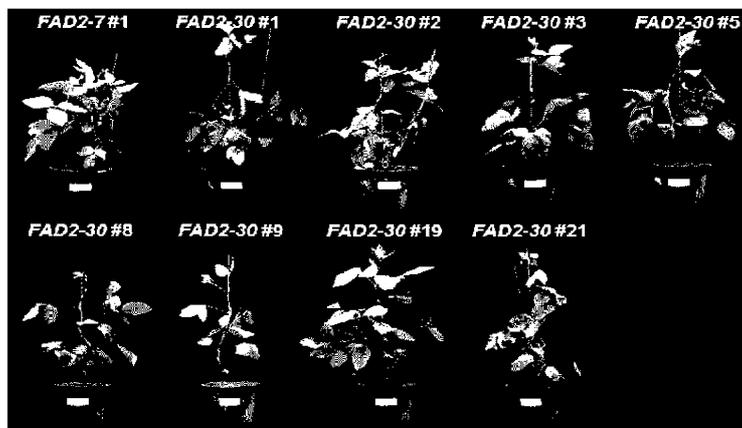


(a)

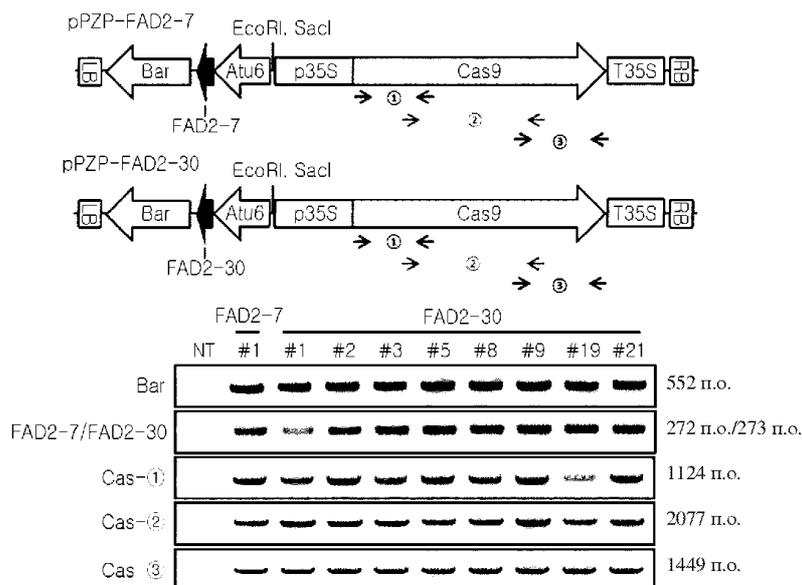


(b)

Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

Образец	Количество повторов	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	
FAD-2-7	1	7,8	2,6	83,0	2,1	4,6	
FAD-2-7	1	2	8,3	2,6	79,8	3,5	5,8
FAD-2-7	1	3	8,4	2,6	78,6	3,8	6,5
FAD-2-30	1	1	8,6	2,2	78,7	4,1	6,4
FAD-2-30	1	2	8,1	2,0	80,1	2,7	7,1
FAD-2-30	2	1	8,2	2,9	79,4	7,0	5,5
FAD-2-30	2	2	8,2	2,9	82,6	1,8	4,5
FAD-2-30	2	3	8,2	3,1	78,4	4,3	5,9
FAD-2-30	3	1	8,1	3,0	80,9	2,5	5,5
FAD-2-30	3	2	8,7	3,3	76,9	4,3	6,8
FAD-2-30	5	1	8,4	3,2	79,1	3,3	6,0
FAD-2-30	5	2	10,1	3,0	73,4	5,9	7,7
FAD-2-30	5	3	8,8	2,9	74,4	6,0	7,9
FAD-2-30	8	1	8,2	3,3	82,3	1,7	4,5
FAD-2-30	8	2	7,6	3,1	83,3	1,6	4,3
FAD-2-30	8	3	7,3	3,1	83,1	1,5	5,1
FAD-2-30	9	1	8,0	3,1	80,1	3,9	4,9
FAD-2-30	9	2	8,3	3,1	78,7	3,5	6,4
FAD-2-30	9	3	7,8	3,8	82,4	1,6	4,5
FAD-2-30	19	1	8,5	3,4	75,2	6,3	6,7
FAD-2-30	19	2	8,5	2,9	75,5	6,1	7,1
FAD-2-30	21	1	7,8	2,9	82,4	2,5	4,3
FAD-2-30	21	2	9,2	3,0	70,9	7,5	9,4
FAD-2-30	21	3	8,1	2,9	79,6	3,3	6,0
Pungsan		10,6	3,6	23,5	52,3	10,0	
Kwangan		12,5	3,4	38,2	36,2	9,5	
Hosim		7,8	2,6	80,5	3,6	5,5	

Фиг. 5

ГЕН	Целевая последовательность	Частота инсерционно-делеционной мутации (%)
FAD2A	GTGTTTGGAAACCCCTTGAGAGAGG	99,20%
FAD2B	GTGTTTGGAAACCCCTTGAGAGAGG	100%

Фиг. 6

Chr10_FAD2-7		Тип
AAGGGAAGAAGCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATT	Дикий тип	
AAGGGAAGAAGCCTCTCT---GGGTTCCAAACACAAAGCCACCATT		-3
AAGGGAAGAAGCCTC-----TTCCAAACACAAAGCCACCATT		-9
AAGGGAAGAAGCCTC-----TCT---ACACAAAGCCACCATT		-12
AAGGGAAGAAGCCTCTCT---GGTTCACAAACACAAAGCCACCATT		-4
AAGG-----GTTCACAAACACAAAGCCACCATT		-19
AAGGGAAGAAGCCTC-----TCTCAAAACACAAAGCCACCATT		-9
AAGGGAAGAAGCCTCT-----GGTTCACAAACACAAAGCCACCATT		-6
AAGGGAAGAAGCCTCTCT--AGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATT		-2
AAGGGAAGAAGCCTCTCTTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATT		+1
Chr20_FAD2-7		Тип
CAGCAGAAGAAGCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTTCAC	Дикий тип	
CAGCAGAAGAAGCCTCTCT----GGTTCACAAACACAAAGCCACCATTTCAC		-4
CAGCAGAAGAAGCCTCTC----GGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTTCAC		-4
CAGCAGAAGAAGCCTCTC-----TTCCAAACACAAAGCCACCATTTCAC		-7
CAGCAGAAGAAGCCTCT-----AGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTTCAC		-4
CAGCAGAAGAAGCCTCTCTTTTTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATT		+4
CAGCAG-----AACACAAAGCCACCATTTCAC		-22
GGGAGGTGGAGGCCGTGTGG-----CCAAACACAAAGCCACCATTTCAC		-7,+1
CAGCAGAAGAAGCCTCTCT-----AACACAAAGCCACCATTTCAC		-11
CAGCAGAAGAAGCCTCTT-CAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTTCAC		-1

Фиг. 7

Хромосома 10	Частота более минимальной	Вставки	Делеции	Частота инсерционно-делеционной мутации
FAD2-7#1-1	11252	0	95	95 (0,8%)
FAD2-30#2-4	13523	0	13410	13410 (99,2%)
FAD2-30#3-1	18132	0	70	70 (0,4%)
FAD2-30#3-2	14784	0	14771	14771 (99,9%)
FAD2-30#8-1	29358	0	29327	29327 (99,9%)
FAD2-30#8-2	28970	0	27798	27798 (96,0%)
FAD2-30#9-1	18012	11	9438	9449 (52,5%)
FAD2-30#19-1	21332	0	21317	21317 (99,9%)
FAD2-30#21-2	22833	0	22818	22818 (99,9%)
FAD2-30#21-5	26990	0	26981	26981 (100,0%)
FAD2-30#22-5	19492	0	19483	19483 (100,0%)
FAD2-30#22-6	26485	0	26454	26454 (99,9%)

Фиг. 8a

Хромосома 20	Частота более минимальной	Вставки	Делеции	Частота инсерционно-делеционной мутации
FAD2-7#1-1	22943	0	22931	22931 (99,9%)
FAD2-30#2-4	23466	0	11463	11463 (48,8%)
FAD2-30#3-1	25145	0	73	73 (0,3%)
FAD2-30#3-2	25790	18	25742	25760 (99,9%)
FAD2-30#8-1	19141	22	19111	19133 (100,0%)
FAD2-30#8-2	26126	54	26063	26117 (100,0%)
FAD2-30#9-1	23439	23294	129	23423 (99,9%)
FAD2-30#19-1	15524	7	15511	15518 (100,0%)
FAD2-30#21-2	18724	5	18719	18724 (100,0%)
FAD2-30#21-5	23165	2	23163	23165 (100,0%)
FAD2-30#22-5	4582	2	4580	4582 (100,0%)
FAD2-30#22-6	3360	0	3360	3360 (100,0%)

Фиг. 8b

Хромосома 10	Вставка/ делеция	Локальное выравнивание последовательностей
Дикый тип		AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCC AA
FAD2-7#1-1		AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCA A
FAD2-30#2-4	-8	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTC-----TCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
	-5	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTCT-----GTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#3-1		AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCA A
FAD2-30#3-2	-6	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTCT-----TTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
	-2	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTCT--AGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#8-1	-7	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTC-----TTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
	-2	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGC--CTCTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#8-2	-7	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTC-----TTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
	-5	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTCT-----GTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#9-1	-7	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTC-----TTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
		AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCA A
FAD2-30#19-1	-8	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTC-----TCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
	-7	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTC-----TTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#21-2	-7	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTC-----TTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#21-5	-2	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGC--CTCTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#22-5	-2	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTCT--AGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30&22-6	-2	AAAGTGGAAAGTTCAAGGGAAGAAGCCTCTCT--AGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA

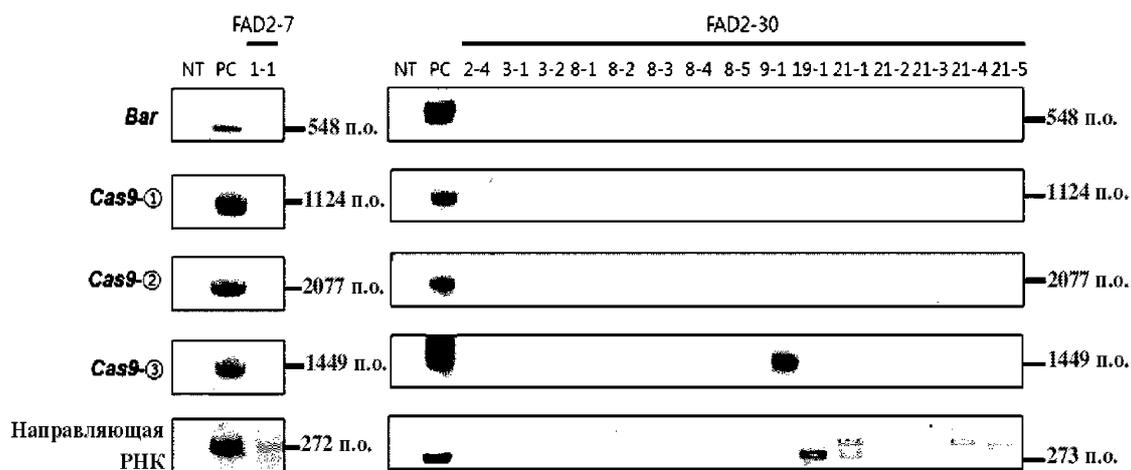
Фиг. 9а

Хромосома 20	Вставка/ делеция	Локальное выравнивание последовательностей
Дикый тип		CAGAAGAAGCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-7#1-1	-4	CAGAAGAAGCCTCTCT---GGGTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
	-4	CAGAAGAAGCCTCTCT---GGTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30&2-4		CAGAAGAAGCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
	-8	CAGAAGAAGCCTCTC-----TCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#3-1		CAGAAGAAGCCTCTCTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#3-2	-2	CAGAAGAAGCCTCTCT--AGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#8-1	-2	CAGAAGAAGCCTCTCT--AGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#8-2	-2	CAGAAGAAGCCTCTCT--AGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#9-1	+1	CAGAAGAAGCCTCTCTTCAAGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#19-1	-3	CAGAAGAAGCCTCTCT---GGGTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#21-2	-7	CAGAAGAAGCCTCTC-----TTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
	-2	CAGAAGAAGCCTCTCT--AGGGTTCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#21-5	-11	CAGAAGAAGCCTCTCT-----AACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#22-5	-10	CAGAAGAAGCCTC-----TCCAAACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA
FAD2-30#22-6	-11	CAGAAGAAGCCTCTCT-----AACACAAAGCCACCATTCACTGTTGGCCAA

Фиг. 9б



Фиг. 10



Фиг. 11

