



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/8212 (2018.08); C12N 15/8213 (2018.08); C12N 15/8241 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2015112573, 09.09.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.09.2013Дата регистрации:
11.02.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
07.09.2012 US 61/697,890;
06.09.2013 US 14/020,694

(43) Дата публикации заявки: 27.10.2016 Бюл. № 30

(45) Опубликовано: 11.02.2019 Бюл. № 5

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 07.04.2015(86) Заявка РСТ:
US 2013/058766 (09.09.2013)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/039970 (13.03.2014)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

СПАНГЕНБЕРГ Герман (AU),
САХАБ Сарина (AU),
МЭЙСОН Джон (AU)

(73) Патентообладатель(и):

ДАУ АГРОСАЙЕНСИЗ ЭлЭлСи (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20100257638 A1, 07.10.2010.BARGMANN ET AL: "Positive Fluorescent
Selection Permits Precise, Rapid, and In-Depth
Overexpression Analysis in Plant Protoplasts",
PLANT PHYSIOLOGY, vol. 149, 2009, pp.
1231-1239. CARDOZA ET AL: "Increased
Agrobacterium-mediated transformation and
rooting efficiencies in canola (Brassica napus
L.) from hypocotyl (см. прод.)

2 6 7 9 5 1 0 C 2

R U 2 6 7 9 5 1 0 C 2

**(54) ОБОГАЩЕНИЕ АКТИВИРУЕМОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЕЙ СОРТИРОВКИ КЛЕТОК (FACS)
ДЛЯ СОЗДАНИЯ РАСТЕНИЙ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к способу получения растения из популяции клеток, включающему выделение при помощи активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS) инкапсулированного в альгинат натрия протопласта растения, содержащего представляющий интерес полинуклеотид; регенерацию растения из выделенного

растительного протопласта и культивирование данного растения. Изобретение позволяет эффективно отбирать протопласты с жизнеспособностью 95-98% от общего количества выделенных клеточных протопластов и регенерировать растения из вышеуказанных протопластов. 2 н. и 7 з.п. ф-лы, 23 табл., 80 ил., 7 пр.

R U 2 6 7 9 5 1 0 C 2

R U 2 6 7 9 5 1 0 C 2

(56) (продолжение):

segment explants", PLANT CELL REPORTS, vol. 21, 2003, pp. 599-604. DURAI ET AL: "A Bacterial One-Hybrid Selection System for Interrogating Zinc Finger-DNA Interactions", COMBINATORIAL CHEMISTRY & HIGH THROUGHPUT SCREENING, vol. 9, 2006, pp. 301-311. ЛУТОВА Л. А., Биотехнология высших растений, Издательство С.-Петербургского университета, 2010, стр. 62-209.

R U
2 6 7 9 5 1 0 C 2

RUSSIAN FEDERATION



(19)

RU (11)

2 679 510⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C12N 15/8212 (2018.08); C12N 15/8213 (2018.08); C12N 15/8241 (2018.08)

(21)(22) Application: 2015112573, 09.09.2013

(24) Effective date for property rights:
09.09.2013

Registration date:
11.02.2019

Priority:

(30) Convention priority:
07.09.2012 US 61/697,890;
06.09.2013 US 14/020,694

(43) Application published: 27.10.2016 Bull. № 30

(45) Date of publication: 11.02.2019 Bull. № 5

(85) Commencement of national phase: 07.04.2015

(86) PCT application:
US 2013/058766 (09.09.2013)

(87) PCT publication:
WO 2014/039970 (13.03.2014)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

SPANGENBERG German (AU),
SAKHAB Sarina (AU),
MEJSON Dzhon (AU)

(73) Proprietor(s):

DAU AGROSAJENSIZ EIEISi (US)

R U
2 6 7 9 5 1 0 C 2

(54) FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING (FACS) ENRICHMENT TO GENERATE PLANTS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, in particular to a method for generating a plant from a population of plant cells comprising isolating a plant protoplast encapsulated by sodium alginate by fluorescence cell sorting (FACS) enrichment, wherein the plant protoplast comprising a polynucleotide of

interest; regenerating a plant from the isolated plant protoplast and culturing said plant.

EFFECT: invention allows efficiently selecting protoplasts with a viability of 95-98 % of the total number of isolated cell protoplasts and regenerating plants from said protoplasts.

9 cl, 23 tbl, 80 dwg, 7 ex

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Настоящая заявка притязает на приоритет на основании предварительной заявки на выдачу патента США с регистрационным номером 61/697890, поданной 7 сентября 2012.

5 ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Изобретение относится к области активируемой флуоресценцией сортировки клеток для создания растений. В предпочтительном варианте в описании раскрыто FACS-обогащение генетически отредактированных регенерируемых протопластов для создания fertильных подвергнутых редактированию растений.

10 УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Активируемый флуоресценцией сортировщик клеток (FACS) был изобретен в конце 1960-х годов Bonner, Sweet, Hulett, Herzenberg и другими для осуществления проточной цитометрии и клеточной сортировки на живых клетках. Becton Dickinson Immunocytometry Systems начали производить коммерческие устройства в начале 1970-х годов.

15 Активируемая флуоресценцией сортировка клеток (FACS) является специальным типом проточной цитометрии. Она обеспечивает осуществление способа сортировки гетерогенной смеси биологических клеток в две или большее количество емкостей, по одной клетке за один раз, на основе специфичного светорассеяния и характеристик флуоресценции каждой клетки. Это полезный научный инструмент, так как обеспечивает 20 быструю, объективную и количественную регистрацию флуоресцентных сигналов от отдельных клеток, а также физическое разделение клеток, представляющий особый интерес.

Суспензия клеток захватывается в центр узкого, быстро протекающего потока жидкости. Поток распределяется таким образом, что имеется большое расстояние 25 между клетками по сравнению с их диаметром. Механизм вибрации вызывает разбивание потока клеток на отдельные капельки. Систему регулируют таким образом, чтобы было маловероятным нахождение более одной клетки в капле. Непосредственно перед тем, как поток разбивается на капельки, поток проходит через устройство, измеряющее флуоресценцию, где происходит измерение представляющей интерес характеристики 30 флуоресценции каждой клетки. Электрически заряжающее кольцо помещают непосредственно в точке, в которой поток разбивается на капельки. Заряд подают на кольцо на основе произведенного непосредственно перед этим измерения интенсивности флуоресценции, и противоположный заряд улавливается на капле, в то время как она отрывается от потока. Затем заряженные капельки проскаивают через систему,

35 вызывающую электростатическое отклонение, которая отклоняет капельки по направлению к емкостям на основании их заряда. В некоторых системах заряд подают непосредственно на поток, и капля, отрывающаяся при разрыве, сохраняет заряд того же знака, что и поток. Затем поток возвращается в нейтральное состояние после того, как отрывается капля при разрыве.

40 В качестве меток в проточной цитометрии можно использовать широкий ряд флуорофоров. Флуорофоры или просто «флуоресцирующие средства» обычно связывают с антителом, которое распознает характерный элемент-мишень на клетке или в клетке; они также могут быть связаны с химической структурной единицей, обладающей аффинностью по отношению к клеточной мемbrane или другой клеточной структуре.

45 Каждый флуорофор имеет характерную длину волны пика возбуждения и эмиссии, и спектры эмиссии часто перекрываются. Следовательно, сочетание меток, которое можно использовать, зависит от длины волны лампы (ламп) или лазера(-ов), используемых для возбуждения флуорохромов, и имеющихся детекторов.

Активируемая флуоресценцией сортировка клеток (FACS) обеспечивает быстрый способ выделения больших количеств флуоресцентно меченых клеток из гетерогенной смеси клеток. Коллекции трансгенных растений со специфичной для типа клеток экспрессией генов флуоресцирующих маркеров, таких как зеленый флуоресцирующий белок (GFP), идеально подходят для исследований отдельных типов клеток с помощью FACS.

Было показано, что проточный цитометрический анализ и флуоресцентно активируемая сортировка клеток (FACS) протопластов растений осуществимы на практике, кроме того, такая методика дала ценные результаты в нескольких разных областях исследований (Harkins и Galbraith, 1984; Galbraith et al., 1995; Sheen et al., 1995). Например, FACS протопластов из растений *Arabidopsis*, экспрессирующих тканеспецифичные флуоресцирующие белковые маркеры, применяли для исследования как базовых, так и стимулируемых факторами окружающей среды профилей транскрипции в конкретных типах клеток (Birnbaum et al., 2003; Brady et al., 2007; Gifford et al., 2008; Dinneny et al., 2008), и проточную цитометрию применяли для анализа продуцирования активных форм кислорода и запрограммированной клеточной гибели среди протопластов табака (*Nicotiana tabacum*; Lin et al., 2006). Широкий выбор флуоресцирующих средств доступен для исследования множества физиологических параметров в растениях, например, цис-регуляторных элементов, слитых с флуоресцирующими белками (Haseloff and Siemering, 2006), генетически кодируемые молекулярные сенсоры (Looger et al., 2005) или основанные на красителях сенсоры (Haugland, 2002) могут быть использованы в сочетании с цитометрией для измерения различных биологических процессов. Однако в таком способе имеются некоторые недостатки, связанные с чувствительностью анализов, и следовательно, есть место для усовершенствования.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Конкретный вариант изобретения относится к способу получения растения из популяции растительных клеток посредством выделения протопласта растения с использованием представляющего интерес полинуклеотида путем обеспечения популяции растительных протопластов, имеющей по меньшей мере один протопласт, содержащий представляющий интерес полинуклеотид и флуоресцирующий маркер, при этом популяция по существу не содержит растительных протопластов, содержащих флуоресцирующий маркер и не содержащих представляющий интерес полинуклеотид; при этом растительный протопласт инкапсулируют в альгинат натрия; отделения по меньшей мере одного протопласта, содержащего представляющий интерес полинуклеотид и флуоресцирующий маркер, от остальных растительных протопластов в популяции и, таким образом, выделения растительного протопласта, содержащего представляющий интерес полинуклеотид; регенерации растения из указанного выделенного растительного протопласта; и культивирования указанного растения.

Другим вариантом осуществления изобретения может быть растение, регенерированное посредством выделения растительного протопласта, содержащего представляющий интерес полинуклеотид, интегрированный в геном растительного протопласта, путем получения популяции растительных протопластов, имеющей по меньшей мере один протопласт, содержащий представляющий интерес полинуклеотид и флуоресцирующий маркер; при этом растительный протопласт инкапсулируют в альгинат натрия; извлечения микрокаллусов из популяции протопластов, содержащих представляющий интерес полинуклеотид и флуоресцирующий маркер, при этом по меньшей мере один протопласт, который содержит представляющий интерес

полинуклеотид и флуоресцирующий маркер, был трансформирован представляющим интерес полинуклеотидом и полинуклеотидом, кодирующим флуоресцирующий маркер; регенерации растения из указанных микрокаллусов; и культивирования указанного растения.

- 5 Альтернативные варианты включают способы получения трансгенного растения, при этом способ может включать получение популяции растительных протопластов, имеющей по меньшей мере один протопласт, содержащий представляющий интерес полинуклеотид и флуоресцирующий маркер, при этом по меньшей мере один протопласт содержит сайт-специфичную нуклеазу, так что представляющий интерес полинуклеотид
- 10 способен подвергаться интеграции в геном по меньшей мере одного растительного протопласта за счет гомологичной рекомбинации в сайте распознавания сайт-специфичной нуклеазой, и при этом растительный протопласт инкапсулируется в альгинат натрия; отделение по меньшей мере одного протопласта, содержащего представляющий интерес полинуклеотид и флуоресцирующий маркер, от остальных
- 15 растительных протопластов в популяции; регенерацию трансгенного растения по меньшей мере из одного протопласта; и культивирование указанного трансгенного растения.

Вышеупомянутые и другие характерные признаки станут более понятными из следующего подробного описания нескольких вариантов, которое приведено со ссылками на прилагаемые фигуры.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг. 1A-1E: Показано выравнивание последовательностей гена FAD2, полученное с использованием ALIGNX®.

Фиг. 2: Показано филогенетическое древо последовательностей гена FAD2, созданное с использованием JALVIEW® V 2.3 на основе расстояний между ближайшими соседями.

Фиг. 3A-3M': Показано выравнивание последовательностей гена FAD3, созданное с использованием ALIGNX®.

Фиг. 4: Показано филогенетическое древо последовательностей гена FAD3, созданное с использованием JALVIEW® V 2.3 на основе расстояний между ближайшими соседями.

30 Отмеченные последовательности соответствуют следующему: FAD3A'/A'' описана в настоящей заявке как FAD3A'; гаплотип 2 описан в настоящей заявке как FAD3C; гаплотип 1 описан в настоящей заявке как FAD3C''; и гаплотип 3 описан в настоящей заявке как FAD3A''.

Фиг. 5: Показана плазмидная карта pDAB104010, которая является типичной кассетой экспрессии нуклеазы с цинковыми пальцами. Схема расположения в такой конструкции сходна со схемой других кассет экспрессии ZFN, где домены цинковых пальцев, 24828 и 24829, были заменены альтернативными доменами цинковых пальцев, которые описаны выше.

Фиг. 6: является иллюстративным многолинейным графиком, показывающим количество ридов последовательностей с делециями в сайте-мишени ZFN на 10000 ридов последовательностей. Ось X на графике означает количество делетированных оснований, ось Y означает количество ридов последовательностей, и ось Z означает кодируемое цветом наименование образцов, которые описаны справа от графика. В качестве конкретного примера показан локус 1 семейства генов FAD2, который содержит 3 сайта-мишени ZFN, A, B и C, с четырьмя представителями семейства генов и двумя контрольными трансфекциями, оцениваемыми в качестве контрольных образцов A и B.

Фиг. 7: (A) Подробное описание осей на фигуре такое же, как в случае фиг. 6. На

фигуре представлены данные, полученные в результате ZFN-таргетинга локуса 4 семейства генов FAD2. Локус содержит два сайта ZFN и две необходимых контрольных трансфекции. Фиг. 7: (B) Специфичный контекст последовательностей (SEQ ID NO: 471-480), окружающих сайт-мишень ZFN, идентифицирующий FAD2A и C, содержащих трехнуклеотидные повторы C, T и G, приводящие к наблюдаемому увеличению количества делеций одного основания при секвенировании локусов FAD2A и C.

5 Фиг. 8: Показана карта плазмида pDAS000130.

Фиг. 9: Показана карта плазмида pDAS000271.

Фиг. 10: Показана карта плазмида pDAS000272.

10 Фиг. 11: Показана карта плазмида pDAS000273.

Фиг. 12: Показана карта плазмида pDAS000274.

Фиг. 13: Показана карта плазмида pDAS000275.

Фиг. 14: Показана карта плазмида pDAS000031.

Фиг. 15: Показана карта плазмида pDAS000036.

15 Фиг. 16: Показана карта плазмида pDAS000037.

Фиг. 17 иллюстрирует конфигурацию ETIP и нагружаемой нуклеиновой кислоты, а также продукт направленной в мишень нагрузки в сайте ETIP в геноме растительной клетки.

ФИГ.18 иллюстрирует трансформацию протопласта с последующей FACS-селекцией 20 направленной в мишень ДНК-нагрузки в ETIP в линии хозяина с использованием реконструирования укороченных поддающихся подсчету и селектируемых маркеров на обоих 3'- и 5'-концах.

25 Фиг. 19А и 19В иллюстрируют зависимую от гомологии репарацию события ETIP канолы, которая возникает в результате двунитевого расщепления ДНК в геномном локусе нуклеазой с цинковыми пальцами (pDAS000074 или pDAS000075) и последующей интеграции донора (pDAS000068, pDAS000070 или pDAS000072) в локус ETIP в хромосоме канолы. Интеграция донора в геномный локус приводит к появлению полностью функционального высоко экспрессирующегося трансгена Ds-red.

30 Фиг. 20 демонстрирует FACS-сортировку протопластов канолы и рассчитанную эффективность трансфекции протопластов канолы, которые трансфицировали, используя pDAS000031 («pDAS31»). Кроме того, представлены результаты FACS-сортировки нетрансформированных протопластов канолы в качестве негативного контроля.

35 Фиг. 21 показывает FACS-сортировку протопластов канолы и рассчитанную эффективность трансфекции в случаях ETIP-протопластов канолы, которые трансфицировали, используя pDAS000064/pDAS000074 (верхний график) и pDAS000064/ pDAS000075 (нижний график).

40 Фиг. 22 показывает FACS-сортировку протопластов канолы и рассчитанную эффективность трансфекции в случаях ETIP-протопластов канолы, которые трансформировали, используя pDAS000068/pDAS000074 (верхний график) и pDAS000068/ pDAS000075 (нижний график).

45 Фиг. 23 показывает FACS-сортировку протопластов канолы и рассчитанную эффективность трансфекции в случаях ETIP-протопластов канолы, которые трансформировали, используя pDAS000070/pDAS000074 (верхний график) и pDAS000070/ pDAS000075 (нижний график).

Фиг. 24 показывает FACS-сортировку протопластов канолы и рассчитанную эффективность трансфекции в случаях ETIP-протопластов канолы, которые трансформировали, используя pDAS000072/pDAS000074 (верхний график) и pDAS000072/ pDAS000075 (нижний график).

Фиг. 25: Показана карта плазмиды pDAS000074.

Фиг. 26: Показана карта плазмиды pDAS000075.

Фиг. 27: Показана карта плазмиды pDAS000064.

Фиг. 28: Показана карта плазмиды pDAS000068.

5 Фиг. 29: Показана карта плазмиды pDAS000070.

Фиг. 30: Показана карта плазмиды pDAS000072.

Фиг. 31 представляет собой схему, показывающую сайты связывания праймеров трансгенной мишени и зонда для анализа с целью оценки количества копий трансгена.

Фиг. 32 демонстрирует файл SEQUENCHER®, показывающий домен распознавания

10 ZFN ДНК FAD2A (bc12075_Fad2a-r272a2 и bc12075_Fad2a-278a2) и сайты связывания ZFN-специфичных праймеров (FAD2A.UnE.F1 и FAD2A.UnE.R1) и эндогенных праймеров (FAD2A/2C.RB.UnE.F1 и FAD2A/2C.RB.UnE.R1).

15 Фиг. 33 представляет собой схему, показывающую сайты связывания эндогенных праймеров и праймеров трансгенной мишени, используемых для выявления интеграции трансгена в FAD2A посредством точной HDR.

Фиг. 34 представляет собой схему, показывающую, где могут встречаться сайты рестрикции эндонуклеазой KpnI в точно отредактированном локусе FAD2A, и где связываются Саузерн-зонды FAD2a 5', hph и FAD2A 3'.

20 Фиг. 35 показывает положение и размер KpnI-фрагментов, зондов FAD2A 5', hph, FAD2A 3' и ожидаемые результаты Саузерн-анализа в случае растений, в которых имеет место интеграция ETIP в локус FAD2A посредством HDR.

25 Фиг. 36 показывает типичные выходные данные, полученные в кПЦР при оценке количества копий. В левой колонке представлены данные, полученные для известного трансгенного растения T_0 с одной случайной вставкой трансгена, используемого в качестве калибровочного образца, по отношению к которому «нормализуют» все другие образцы. Правая колонка относится к известному трансгенному растению T_0 с 5 интеграциями трансгенов. Количество встроенных копий в случае обоих растений определяли, используя Саузерн-анализ. Остальные колонки представляют оценки количества копий в случае предполагаемых трансгенных растений. Обозначения под 30 колонками соответствуют колонкам на графике и могут быть использованы для определения оцениваемого количества копий для каждого трансгенного растения. При использовании компьютерной программы для оценки количества копий, в случае растений дикого типа, нетрансформированных контрольных растений и только 35 плазмидных контролей не получают количества копий, так как они не имеют Сq в случае мишени hph и HMG I/Y.

СПОСОБ(-Ы) ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Временная трансформация протопластов представляет собой широко используемый способ исследования растений, который является быстрым и несложным. Способ можно применять, например, для наблюдения за регуляцией промоторных элементов, чтобы 40 анализировать экспрессию генов или ферментативную активность в ответ на различные стимулы, чтобы исследовать роль транскрипционных факторов или компонентов каскада сигнальной трансдукции или исследовать субклеточную локализацию белков (Sheen, 2001; Yoo et al., 2007). В противоположность стабильной трансформации растений (*Arabidopsis thaliana* является наиболее широко используемой платформой), на которую, как правило, затрачивают месяцы и которая требует использования трансфицирующего агента (обычно *Agrobacterium tumefaciens*), трансфекция протопластов может быть 45 достигнута всего за один день и требует только ДНК в качестве сырья и использования любого химического или основанного на электропорации способа трансфекции. Кроме

того, основанные на временной трансформации анализы могут преодолевать проблемы, с которыми сталкиваются в случае стабильной сверхэкспрессии, такие как плейотропное влияние на развитие или нежизнеспособность, когда целесообразным является основанный на клетках анализ. Однако вследствие того факта, что эффективность трансформации протопластов никогда не составляет 100%, результаты может быть трудно интерпретировать из-за нетрансформированных клеток.

Эффективности трансформации часто бывают низкими и вариабельными (например, Cummins et al., 2007; <10%) и зависят от применяемого способа, а также свойств используемых протопластов и ДНК. Настоящее изобретение относится к области

биотехнологии растений, но может быть применено для всех биологических целей. В частности, варианты осуществления настоящего изобретения относятся к созданию нативных или трансгенных линий растительных клеток из гетерогенной популяции растительных клеток посредством проточно-цитометрической сортировки. Такая линия растительных клеток может быть либо из клеток однодольных, либо клеток двудольных.

Как будет понятно специалисту, в изобретении также применяется линия растительных клеток для регенерации целых фертильных растений.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к основанной на FACS чувствительной селекции, при этом происходит улучшенная селекция в отношении успешно трансформированных клеток. Ранее сообщалось, что

трансформация популяции растительных клеток, таких как суспензионная культура растений, часто приводит к получению трансгенных культур, которые являются гетерогенными и имеют нестабильные уровни экспрессии. Настоящее изобретение, главным образом, относится к получению основанной на растениях системы.

Возможность выделять и выращивать отдельные клетки имеет множество возможных применений. Например, способы, описанные в настоящей публикации, применимы для улучшения процессов, связанных с продуктивностью культур растительных клеток. Однако такое использование широко применимо для всех клеток.

Варианты осуществления настоящего изобретения включают применение проточно-цитометрической сортировки, такой как FACS-методика, для отделения или выделения одного, т.е. индивидуального протопласта, который получают из популяции растительных клеток, используя материалы и способы, известные в данной области. Такие протопласты могут быть трансформированы и способны 1) продуцировать флуоресцирующий маркерный белок или полипептид; 2) продуцировать требуемый продукт; и/или 3) выживать в присутствии агента для селекции. Критерии сортировки в случае FACS могут быть выбраны из группы, состоящей из генетического фона (например, полоидности, анеуплоидии), мутантов, трансгенных событий, продуктов обмена генов и флуоресценции (аутофлуоресценции (хлоропласти, метаболиты), флуоресценции, опосредованной флуоресцирующими белками или ферментами). Можно использовать любой флуоресцирующий белок. Агент для селекции может быть использован или не использован.

После отделения или выделения одиночных протопластов в результате проточно-цитометрической сортировки, каждый отдельный трансформированный протопласт подвергают регенерации вплоть до образования микроколонии (микрокаллуса) посредством совместного культивирования. Природа растительного источника не ограничена такими линиями, сортами и видами, протопласти которых обладают способностью регенерировать до образования микроколонии или микрокаллуса. Следовательно, настоящее изобретение будет применимо по отношению ко всем сортам и видам растений, для которых был разработан или будет предоставлен

протокол регенерации. Таким образом, настоящее изобретение может быть осуществлено с использованием всех сортов и видов растений, для которых разработан или будет представлен в будущем этап регенерации.

Микроколония, как таковая, может быть отделена или извлечена из материала

⁵ питающих клеток и культивирована до образования линии растительных клеток.

Варианты осуществления настоящего изобретения также могут включать образование каллусной ткани посредством 1) переноса микроколонии или микрокаллуса на твердую среду для культивирования и 2) культивирования микроколонии или микрокаллуса в присутствии по меньшей мере одного агента для селекции вплоть до образования

¹⁰ трансгенной каллусной ткани, из которой может быть получена линия трансгенных растительных клеток в результате переноса каллусной ткани в жидкую среду для культивирования. Микроколония также может быть извлечена или отделена от материала питающих клеток механическими способами, т.е. путем сбора клонов. В данном случае агент для селекции не требуется, и клетки, составляющие микроколонию,

¹⁵ не должны проявлять резистентность к какому-либо агенту для селекции.

В некоторых вариантах клетки могут содержать гетерогенную популяцию растительных клеток, которые перед тем, как их подвергают проточно-цитометрической сортировке, являются нативными или нетрансформированными клетками и являются стабильно или временно трансформированными по меньшей мере одним

²⁰ экспрессирующим вектором, содержащим по меньшей мере одну гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть оперативно связана с функциональным промотором, при этом указанная по меньшей мере одна гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты кодирует требуемый продукт. В дополнительные вариантах по меньшей мере одна гетерологичная последовательность

²⁵ нуклеиновой кислоты оперативно связана с по меньшей мере одним функциональным промотором, при этом по меньшей мере одна гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты кодирует флуоресцирующий маркерный белок или полипептид, и по меньшей мере одна гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты кодирует резистентность к селектирующему агенту или требуемый продукт.

³⁰ Дополнительные варианты могут включать случаи, когда клетки могут дополнительно содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует требуемый продукт, который должен накапливаться в предлагаемой линии трансгенных растительных клеток.

В других вариантах геном клетки-хозяина может быть экспрессирован так, чтобы

³⁵ рекомбинантный белок или пептид могли быть модифицированы посредством рекомбинации, например, гомологичной рекомбинации или гетерологичной рекомбинации.

Любые полученные (трансгенные) моноклональные или биклональные линии растительных клеток могут быть обработаны и культивированы в присутствии

⁴⁰ предшественников, индукторов, гормонов, стабилизаторов, ингибиторов, молекул РНК-и/ми-РНК, соединений для передачи сигнала, ферментов и/или элиситоров дополнительно или вместо суспензии векторов для получения рекомбинантных белков или метаболитов.

Гетерологичные нуклеиновые кислоты могут кодировать гены бактериального,

⁴⁵ грибкового, растительного или нерастительного происхождения, такие как гены слитых белков и белков животного происхождения. Продуцируемые полипептиды могут быть использованы для получения полипептидов, которые могут быть очищены из них для применения в разных случаях. Белки, которые могут быть получены способом согласно

изобретению, включают гетеродимеры, иммуноглобулины, слитые антитела и одноцепочечные антитела. Кроме того, указанные выше гены могут быть изменены для получения белков с измененными характеристиками.

Варианты осуществления настоящего изобретения включают возможность получать

- 5 большое разнообразие белков и полипептидов. Такие варианты также могут включать способы получения по меньшей мере одного требуемого продукта, выбранного из группы, состоящей из гетерологичных белков или полипептидов, вторичных метаболитов и маркеров. Способ включает применение линии растительных клеток, которая создана согласно изобретению для продуцирования и накапливания по меньшей
- 10 мере одного требуемого продукта, который затем получают или выделяют из продуцирующих клеток или из культуральной среды.

Дополнительные способы включают способы создания по меньшей мере одного внеклеточного гетерологичного белка, включающие стадии 1) стабильного введения в клетки-мишени, составляющие исходную популяцию растительных клеток, первой

- 15 нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный белок или требуемый продукт; 2) получения протопластов из растительных клеток в суспензии, полученных из указанной суспензионной культуры растения, при этом протопласти дополнительно трансформированы и способны i) продуцировать флуоресцирующий маркерный белок или полипептид и ii) выживать в
- 20 присутствии агента для селекции; 3) отделения отдельных трансформированных протопластов, для которого препарат протопластов подвергают FACS; 4) регенерации отдельного трансформированного протопласта вплоть до образования микроколонии или микрокаллуса в результате совместного культивирования в присутствии материала питающих клеток; 5) создания каллусной ткани посредством i) переноса микроколонии
- 25 или микрокаллуса на твердую культуральную среду и ii) культивирования микроколонии или микрокаллуса в присутствии по меньшей мере одного агента для селекции вплоть до образования трансгенной каллусной ткани; 6) создания линии трансгенных растительных клеток путем переноса каллусной ткани в жидкую культуральную среду;
- 30 7) вызывания или обеспечения возможности экспрессии с нуклеиновой кислоты гетерологичного белка или требуемого продукта посредством обеспечения соответствующих условий культивирования; и 8) сбора накопленного гетерологичного белка или требуемого продукта из продуцирующих клеток. Такое выделение может быть осуществлено только обычными способами и может включать или не включать частичную или полную очистку.

- 35 В каждой конструкции можно использовать более одного гена. Множество векторов, каждый из которых содержит одну или несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих выбранный гетерологичный белок, могут быть введены в клетки-мишени, которые описаны в настоящей публикации или в других публикациях. Такой подход также может быть применимым для получения множественных субъединиц ферmenta.

- 40 Флуоресцирующим маркерным белком или полипептидом может быть белок, выявляемый по флуоресценции, такой как GUS, такие флуоресцирующие белки, как GFP или DsRed, люцифераза и т.д. Предпочтительно репортером является неинвазивный маркер, такой как DsRed или GFP.

- 45 Способы согласно настоящему изобретению можно применять для селекции в отношении определенных растений, которые необходимо выращивать. Выбор представляющего интерес гена можно проводить несколькими путями. Имеется большое количество способов встраивания ДНК в растительную клетку-хозяина. Такие способы включают трансформацию Т-ДНК с использованием *Agrobacterium tumefaciens* или

Agrobacterium rhizogenes в качестве трансформирующего агента, слияния, инъекции, биобаллистики (бомбардировки микрочастицами), нитевидных кристаллов карбида кремния, направленной подачи аэрозоля, ПЭГ или электропорации, а также других возможных способов. Если для трансформации используют *Agrobacteria*, встраиваемую

- 5 ДНК необходимо клонировать в специальных плазмидах, а именно либо в промежуточном векторе, либо в бинарном векторе. Промежуточные векторы могут быть интегрированы в Ti- или Ri-плазмиду посредством гомологичной рекомбинации благодаря наличию последовательностей, которые гомологичны последовательностям в Т-ДНК. Ti- или Ri-плазмида также содержит область *vir*, необходимую для переноса
- 10 Т-ДНК. Промежуточные векторы не могут реплицироваться сами в *Agrobacteria*. Промежуточный вектор может быть перенесен в *Agrobacterium tumefaciens* с помощью хелперной плазмиды (конъюгации). Бинарные векторы могут сами реплицироваться как в *E. coli*, так и в *Agrobacteria*. Они содержат селектируемый маркерный ген и линкер или полилинкер, которые обрамлены областями правой и левой границ Т-ДНК. Ими
- 15 можно непосредственно трансформировать *Agrobacteria* (Holsters, 1978). *Agrobacterium*, используемая в качестве клетки-хозяина, должна содержать плазмиду, несущую область *vir*. Область *vir* необходима для переноса Т-ДНК в растительную клетку. Может содержаться дополнительная Т-ДНК. Бактерию, трансформированную таким образом, используют для трансформации растительных клеток. Эксплантаты растений
- 20 преимущественно можно культивировать с *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes* для переноса ДНК в растительную клетку. Затем могут быть регенерированы целые растения из инфицированного растительного материала (например, кусочки листьев, участки стебля, корни, а также протопласты или культивируемые в суспензии клетки) в подходящей среде, которая может содержать антибиотики или биоциды для
- 25 селекции. Затем полученные таким образом растения могут быть тестированы в отношении присутствия встроенной ДНК. Нет никаких специальных требований в отношении плазмид в случае инъекции и электропорации. Можно использовать обычные плазмиды, такие как, например, производные pUC.

Трансформированные клетки растут внутри растений обычным образом. Они могут образовывать зародышевые клетки и передавать трансформированный признак(-и) растениям-потомкам. Такие растения могут быть выращены обычным образом и скрещены с растениями, которые имеют такие же трансформированные наследственные факторы или другие наследственные факторы. Полученные гибридные особи обладают соответствующими фенотипическими свойствами.

- 35 В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения гены, кодирующие представляющие интерес белки, экспрессируются с транскрипционных единиц, встроенных в геном растения. Предпочтительно указанные транскрипционные единицы представляют собой рекомбинантные векторы, способные к стабильной интеграции в геном растения и позволяющие осуществлять селекцию линий
- 40 трансформированных растений, экспрессирующих мРНК, кодирующую белки.

После интеграции встроенной ДНК в геном она оказывается относительно стабильной в геноме (и снова не выходит). В норме она содержит селектируемый маркер, который придает трансформированным растительным клеткам резистентность к биоциду или антибиотику, такому как наряду с прочими канамицин, G418, блеомицин, 45 гигромицин или хлорамфеникол. Селектируемые маркеры растений также обычно могут обеспечивать резистентность к различным гербицидам, таким как глюфосинат (например, PAT/bar), глифосат (EPSPS), ALS-ингибиторам (например, имидазолинон, сульфонилмочевине, сульфонанилиду триазолопиримидина и другим), бромоксилину,

резистентность к ингибиторам HPPD, ингибиторам РРО, ингибиторам АСС-азы и многим другим. Отдельно используемый маркер должен соответствующим образом обеспечивать возможность отбора трансформированных клеток, но не клеток, которые не содержат встроенной ДНК. Представляющий интерес ген(-ы) предпочтительно

5 экспрессируется либо конститтивными, либо индуцируемыми промоторами в растительной клетке. После экспрессии мРНК транслируется в белки, при этом включая представляющие интерес аминокислоты в белок. Гены, кодирующие белок, экспрессируемый в растительных клетках, могут быть под контролем конститтивного промотора, тканеспецифичного промотора или индуцируемого промотора.

10 Существует несколько способов введения чужеродных рекомбинантных векторов в растительные клетки и получения растений, которые стабильно содержат и экспрессируют введенный ген. Такие способы включают введение генетического материала с покрытием в виде микрокапсул непосредственно в клетки (патенты США № 4945050, Cornell, и 5141131, DowElanco, в настоящее время Dow AgroSciences, LLC).

15 Кроме того, растения могут быть трансформированы с использованием основанной на Agrobacterium методики, см. патенты США № 5177010, Университет Толедо; 5104310 Texas A&M; заявку на выдачу Европейского патента 0131624B1; заявки на выдачу Европейского патента 120516, 159418B1 и 176112, Schilperoot; патенты США № 5149645, 5469976, 5464763 и 4940838 и 4693976, Schilperoot; заявки на выдачу Европейского

20 патента 116718, 290799, 320500, все Max Planck; заявки на выдачу Европейского патента 604662 и 627752 и патент США № 5591616, Japan Tobacco; заявки на выдачу Европейского патента 0267159 и 0292435 и патент США № 5231019, все Ciba Geigy, в настоящее время Syngenta; патенты США № 5463174 и 4762785, оба Calgene; и патенты США № 5004863 и 5159135, оба Agracetus. Другая методика трансформации включает методику на основе

25 нитчатых кристаллов. См. патенты США № 5302523 и 5464765, оба Zeneca, в настоящее время Syngenta. Другая методика трансформации посредством прямой доставки ДНК включает методику направленной подачи аэрозоля. См. патент США № 6809232.

Методику электропорации также применяли для трансформации растений. См. WO 87/06614, Boyce Thompson Institute; патенты США № 5472869 и 5384253, оба Dekalb; и WO 30 92/09696 и WO 93/21335, обе Plant Genetic Systems. Кроме того, вирусные векторы также можно использовать для получения трансгенных растений, экспрессирующих представляющие интерес белок. Например, однодольные растения могут быть трансформированы вирусным вектором с использованием способов, описанных в патенте США № 5569597, Mycogen Plant Science и Ciba-Geigy (в настоящее время Syngenta),

35 а также в патентах США № 5589367 и 5316931, оба Biosource, в настоящее время Large Scale Biology.

Как упоминалось ранее, способ, посредством которого вводят конструкцию ДНК в растение-хозяина, не является критическим для настоящего изобретения. Можно применять любой способ, который обеспечивает эффективную трансформацию.

40 Например, различные способы трансформации растительных клеток описаны в настоящей публикации и включают использование Ti- или Ri-плазмид и тому подобных для осуществления опосредованной Agrobacterium трансформации. В многих случаях будет желательно иметь конструкцию, используемую для трансформации, ограниченную с одной или обеих сторон границами Т-ДНК, более конкретно правой границей. Это

45 особенно полезно в том случае, когда для конструкции используют Agrobacterium tumefaciens или Agrobacterium rhizogenes в качестве средства для трансформации, хотя границы Т-ДНК могут быть применимы в случае других способов трансформации. В том случае, когда используют Agrobacterium для трансформации растительных клеток,

можно применять вектор, который может быть введен в хозяина для гомологичной рекомбинации с Т-ДНК или Ti-, или Ri-плазмидой, присутствующей в клетке хозяина. Введение вектора может быть осуществлено посредством электропорации, трехродительского скрещивания и других способов трансформации грамотрицательных бактерий, которые известны специалистам в данной области. Способ трансформации векторов в хозяина *Agrobacterium* не является критичным для настоящего изобретения. Ti- или Ri- плазмида, содержащая Т-ДНК для рекомбинации, может быть способна или неспособна вызывать галлообразование и не является критичной для указанного изобретения, при условии, что гены vir присутствуют в указанном хозяине.

В некоторых случаях, когда *Agrobacterium* используют для трансформации, экспрессирующая конструкция, находящаяся в границах Т-ДНК, будет встроена в вектор широкого спектра, такой как pRK2 или его производные, которые описаны в публикации Ditta et al. (1980) и ЕРО 0 120 515. В экспрессирующую конструкцию и Т-ДНК могут быть включены один или несколько маркеров, которые описаны в настоящей публикации, которые обеспечивают возможность селекции трансформированных *Agrobacterium* и трансформированных растительных клеток. Конкретный используемый маркер не важен для настоящего изобретения, при этом предпочтительный маркер зависит от используемого хозяина и конструкции.

Для трансформации растительных клеток с использованием *Agrobacterium* эксплантаты можно объединить и инкубировать с трансформированными *Agrobacterium* в течение периода времени, достаточного для того, чтобы обеспечить их трансформацию. После трансформации агробактерии убивают в ходе селекции с использованием подходящего антибиотика, и растительные клетки культивируют, используя подходящую селективную среду. После образования каллусов образование побегов может быть стимулировано благодаря использованию подходящих растительных гормонов согласно способам, хорошо известным в области культивирования тканей растений и регенерации растений. Однако промежуточная стадия каллусов не всегда является необходимой. После образования побегов указанные растительные клетки могут быть перенесены в среду, которая стимулирует образование корней, завершая таким образом регенерацию растений. Затем растения могут быть выращены до получения семян, и указанное семя можно использовать для получения будущих поколений. Независимо от способа трансформации ген, кодирующий бактериальный белок, предпочтительно включают в вектор для переноса генов, адаптированный для экспрессии указанного гена в растительной клетке за счет включения в вектор регуляторного промоторного элемента растений, а также 3'-нетранслируемых областей терминации транскрипции, таких как Nos и тому подобные.

Кроме многочисленных способов трансформации растений тип ткани, которую подвергают контакту с чужеродными генами, также может варьировать. Такая ткань может включать без ограничения эмбриогенную ткань, каллусную ткань типа I, II и III, гипокотиль, меристему, ткань корня, ткани для экспрессии в флоэме и тому подобные. Почти все растительные ткани могут быть трансформированы во время дифференцировки с использованием подходящих способов, описанных в настоящей публикации.

Как указано выше, при необходимости можно использовать множество селектируемых маркеров. Предпочтение конкретному маркеру отдается по решению специалиста в данной области, но любой из следующих селектируемых маркеров можно использовать вместе с любым другим геном, не указанным в настоящем описании, который может функционировать в качестве селектируемого маркера. Такие

селектируемые маркеры включают без ограничения ген аминогликозидфосфотрансферазы транспозона Tn5 (Aph II), который кодирует резистентность к антибиотикам канамицину, неомицину и G41; резистентность к гигромицину; резистентность к метотрексату, а также такие гены, которые кодируют 5 резистентность или толерантность к глифосату; фосфинотрицину (биалафосу или глюфосинату); ALS-ингибитирующими гербицидами (имидазолинонами, сульфонилмочевинами и триазолопиримидиновыми гербицидами), ингибиторами АСС-азы (например, арилоксипропионатами или циклогександионами) и другим, таким как бромоксинил, и ингибиторам HPPD (например, мезотриону) и тому подобным.

10 В дополнение к селектируемому маркеру может быть желательно использованием репортерного гена. В некоторых случаях репортерный ген может быть использован вместе или без селектируемого маркера. Репортерные гены представляют собой гены, которые обычно не присутствуют в организме или ткани реципиента и обычно кодируют белки, приводящие к определенному изменению фенотипа или ферментативному 15 свойству. Примеры таких генов приведены в публикации Weising et al., 1988.

Предпочтительные репортерные гены включают ген бета-глюкуронидазы (GUS) локуса uidA *E. coli*, ген хлорамфениколацетилтрансферазы из Tn9 *E. coli*, ген зеленого флуоресцирующего белка из биолюминесцирующей медузы *Aequorea victoria* и гены люциферазы светляка *Photinus pyralis*. Затем может быть осуществлен анализ для 20 выявления экспрессии репортерного гена в подходящий момент времени после того, как указанный ген вводят в реципиентные клетки. Предпочтительный подобный анализ включает использование гена, кодирующего бета-глюкуронидазу (GUS) локуса uidA *E. coli*, как описано Jefferson et al. (1987), чтобы идентифицировать трансформированные клетки.

25 Кроме промоторных регуляторных элементов растений в растительных клетках эффективно можно использовать регуляторные промоторные элементы из множества источников, чтобы экспрессировать чужеродные гены. Например, можно использовать промоторные регуляторные элементы бактериального происхождения, такие как промотор октопинсинтазы, промотор нопалинсинтазы, промотор маннопинсинтазы; 30 промоторы вирусного происхождения, такие как промотор вируса мозаики цветной капусты (35S и 19S), 35T (который представляет собой реконструированный промотор 35S, см. патент США № 6166302, в частности, пример 7Е) и тому подобные.

Промоторные регуляторные элементы растений включают без ограничения промотор малой субъединицы рибозо-1,6-дифосфат (RUBP)-карбоксилазы (ssu), промотор бета-35 конглицинина, промотор бета-фазеолина, промотор ADH, промоторы теплового шока и тканеспецифичные промоторы. Могут присутствовать другие элементы, такие как области присоединения к матриксу, области присоединения к каркасу, интроны, энхансеры, последовательности полиденилирования и тому подобные, и при этом они могут повышать эффективность транскрипции или интеграцию ДНК. Такие элементы 40 могут быть или не быть необходимыми для функционирования ДНК, хотя они могут обеспечивать улучшенную экспрессию или функционирование ДНК за счет влияния на транскрипцию, стабильность мРНК и тому подобное. Такие элементы при необходимости могут быть включены в ДНК, чтобы получить оптимальную эффективность трансформированной ДНК в растении. Типичные элементы включают 45 без ограничения Adh-инtron 1, Adh-инtron 6, лидерную последовательность белка оболочки вируса мозаики люцерны, UTR-последовательности осмотина, лидерную последовательность белка оболочки вируса полосатости кукурузы, а также другие, известные специалисту в данной области. Также можно использовать конститутивные

регуляторные промоторные элементы, управляя таким образом непрерывной экспрессией генов во всех типах клетках и во все периоды времени (например, актина, убиквитина, 35S CaMV и тому подобные). Тканеспецифичные регуляторные промоторные элементы ответственны за экспрессию генов в конкретных типах клеток или тканей, таких как листья или семена (например, зепина, олеозина, напина, ACP, глобулина и тому подобных), и их также можно использовать.

Промоторные регуляторные элементы также могут быть активными (или неактивными) во время определенной стадии развития растения, а также активными в тканях и органах растения. Примеры таких элементов включают без ограничения 10 специфичные для пыльцы, специфичные для зародыша, специфичные для кукурузных рылец, специфичные для волокон хлопчатника, специфичные для корней, специфичные для эндосперма семян или специфичные для вегетативной стадии регуляторные промоторные элементы и тому подобные. В некоторых случаях может быть желательным использование индуцируемого регуляторного промоторного элемента, 15 который ответственен за экспрессию генов в ответ на специфичные сигналы, такие как: физический стимул (гены теплового шока), свет (RUBP-карбоксилаза), гормон (Em), метаболиты, химические вещества (чувствительные к тетрациклину) и стресс. Можно использовать другие требуемые элементы для транскрипции и трансляции, которые функционируют в растениях. В данной области известны многочисленные векторы для 20 переноса специфичных для растений генов.

Системы, основанные на РНК-вирусах растений, также могут быть использованы для экспрессии бактериального белка. При этом ген, кодирующий белок, может быть встроен в область промотора генов оболочки подходящего вируса растений, который будет инфицировать представляющее интерес растение-хозяина. Затем может быть 25 экспрессирован белок, обеспечивающий при этом защиту растения от повреждения гербицидами. Системы, основанные на РНК-вирусах растений, описаны в патенте США № 5500360, Mscogen Plant Sciences, Inc., и в патентах США № 5316931 и 5589367, Biosource.

Средства дополнительно повышения уровней толерантности или резистентности. В данном описании показано, что растениям согласно настоящему изобретению могут 30 быть приданы новые признаки резистентности к гербицидам без наблюдаемого неблагоприятного влияния на фенотип, включая урожайность. Такие растения входят в объем настоящего изобретения. Растения, приведенные в качестве примера и предлагаемые в настоящем изобретении, могут выдерживать 2-х, 3-х, 4-х и 5-кратные уровни внесения, например по меньшей мере одного испытываемого гербицида. 35 Повышение уровней толерантности входит в объем настоящего изобретения. Например, в данной области известны разные способы, и они предположительно могут быть оптимизированы и дополнительно разработаны для повышения экспрессии данного гена.

Один из таких способов включает увеличение количества копий исследуемых генов 40 (в кассетах экспрессии и тому подобном). События трансформации также могут быть подвергнуты селекции в отношении таких событий, когда имеется множество копий генов.

Могут быть использованы сильные промоторы и энхансеры для «нагнетания» экспрессии. Примеры таких промоторов включают предпочтительный промотор 35T, 45 который использует энхансеры 35S. Промоторы 35S, убиквитина кукурузы, убиквитина *Arabidopsis*, актина *A.t.* и CSMV могут быть включены для таких применений. Также предпочтительны другие сильные вирусные промоторы. Энхансеры включают двойной энхансер 4 OCS и 35S. Также могут быть использованы области связывания с матриксом

(MAR), например, для повышения эффективности трансформации и экспрессии трансгена.

Перетасовка (направленная эволюция) и факторы транскрипции также могут быть использованы в вариантах осуществления настоящего изобретения.

- 5 Также могут быть сконструированы варианты белков, которые отличаются на уровне последовательностей, но которые сохраняют такую же или сходную общую важную трехмерную структуру, распределение поверхностного заряда и тому подобное. См., например, патент США № 7058515; Larson et al., Protein Sci. 2002 11: 2804-2813, "Thoroughly sampling sequence space: Large-scale protein design of structural ensembles";
- 10 Crameri et al., Nature Biotechnology 15, 436-438 (1997), "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling"; Stemmer, W. P. C. 1994, DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-10751; Stemmer, W. P. C. 1994, Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, Nature 370: 389-391; Stemmer, W. P. C. 1995, Searching sequence space. Bio/
- 15 Technology 13: 549-553; Crameri, A., Cwirla, S. and Stemmer, W. P. C. 1996, Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling, Nature Medicine 2: 100-103; and Crameri, A., Whitehorn, E. A., Tate, E. and Stemmer, W. P. C., 1996, Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling, Nature Biotechnology 14: 315-319.

Активность рекомбинантных полинуклеотидов, встроенных в растительные клетки, 20 может зависеть от влияния эндогенной растительной ДНК вблизи вставки. Таким образом, другой вариант заключается в том, чтобы воспользоваться преимуществом таких событий, которые, как известно, имеют прекрасные положения в геноме растения для инсерций. См., например, публикацию WO 2005/103266 A1, имеющую отношение к событиям *cry1F* и *cry1Ac* у хлопчатника; FAD2, FAD3, при этом такие гены, как AAD1 25 или AAD12 или другие могут быть использованы для замены в таких геномных локусах вместо указанных вставок. Следовательно, согласно настоящему изобретению можно применять целенаправленную гомологичную рекомбинацию. Указанный тип методики является предметом, например, заявки WO 03/080809 A2 и соответствующей опубликованной заявки на выдачу патента США (USPA 20030232410), которые 30 относятся к использованию цинковых пальцев для целенаправленной рекомбинации. Использование рекомбиназ (например, cre-10xand flp-frt) также известно в данной области.

Компьютерное конструирование 5'- или 3'-UTR, наиболее подходящих для 35 синтетических шпилек, также можно осуществлять в объеме настоящего изобретения. Компьютерное моделирование в общем, а также перетасовка генов и направленная 40 эволюция обсуждается в настоящем описании в других разделах. Более конкретно, в отношении компьютерного моделирования и UTR, можно отметить, что способы компьютерного моделирования для применения с целью прогнозирования/оценки 5'- и 3'-UTR-производных согласно настоящему изобретению включают без ограничения: 45 MFold, версию 3.1, доступную из Genetics Corporation Group, Madison, Wis. (см. Zucker et al., Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In RNA Biochemistry and Biotechnology, 11-43, J. Barciszewski & B. F. C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999); Zucker et al., Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. J. Mol. Biol. 288, 911-940 (1999); Zucker et al., RNA Secondary Structure Prediction. In Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, S. Beaucage, D. E. Bergstrom, G. D. Glick, and R. A. Jones eds., John Wiley & Sons, New York, 11.2.1-11.2.10, (2000)), COVE (анализ структуры РНК с использованием ковариационных моделей (способы стохастической бесконтекстной

грамматики) v. 2.4.2 (Eddy and Durbin, Nucl. Acids Res. 1994, 22: 2079-2088), который распространяется свободно в виде исходного текста и который можно загрузить, посетив веб-сайт genetics.wustl.edu/eddy/software/, и FOLDALIGN, также распространяемый свободно и доступный для загрузки с веб-сайта bioinf.au.dk. FOLDALIGN/(см. Finding

- 5 the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences. J. Gorodkin, L. J. Heyer and G. D. Stormo. Nucleic Acids Research, Vol. 25, no. 18 pp 3724-3732, 1997; Finding Common Sequence and Structure Motifs in a set of RNA Sequences. J. Gorodkin, L. J. Heyer, and G. D. Stormo. ISMB 5:120-123, 1997).

Варианты осуществления настоящего изобретения можно применять в сочетании с

- 10 использованием естественно развивающихся или химически индуцированных мутантов (мутанты могут быть выбраны способами скрининга, затем трансформированы другими генами). В растения согласно настоящему изобретению можно вводить различные гены резистентности путем комбинации и/или вызывать развитие генов резистентности. Традиционные способы селекции также можно сочетать с настоящим изобретением, 15 чтобы эффективно объединять, осуществлять интродукцию и улучшать отбор признаков.

Все ссылки, включая публикации, патенты и заявки на выдачу патентов, цитированные и обсуждаемые в настоящем описании, приведены исключительно для их представления до даты подачи настоящей заявки. В настоящем описании ничего не следует

- 20 истолковывать как признание того, что авторы изобретения не имеют права датировать задним числом такое раскрытие на основании предшествующего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приведены для иллюстрации некоторых конкретных признаков и/или аспектов. Такие примеры не следует считать ограничивающими раскрытие

- 25 конкретных описанных признаков или аспектов.

ПРИМЕР 1: ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАРОЛОГИЧНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ-МИШЕНЕЙ FAD2 И FAD3 ИХ БИБЛИОТЕКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИСКУССТВЕННЫХ ХРОМОСОМ КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАС

- 30 Библиотеку бактериальных искусственных хромосом (BAC) получали от коммерческого поставщика (Amplicon Express, Pullman, WA). Библиотека BAC состояла из 110592 BAC-клонов, содержащих фрагменты геномной ДНК (гДНК) с высокой молекулярной массой, выделенные из *Brassica napus* L. сорта DH 10275. гДНК расщепляли ферментом рестрикции либо BamHI, либо HinDIII. Изолированные фрагменты гДНК 35 длиной примерно 135 т.п.н. лигировали в вектор pCC1BAC (Epicentre, Madison, WI) и трансформировали *Escherichia coli* штамма DH10B (Invitrogen). Библиотеку BAC состояла из четного количества BAC-клонов, которые были сконструированы с использованием двух разных ферментов рестрикции. Фактически сконструированная с использованием Hind III BAC-библиотека состояла из 144 отдельных 384-луночных планшетов.
- 40 Подобным образом, сконструированная с использованием BamHI BAC-библиотека состояла из 144 отдельных 384-луночных планшетов. Всего было выделено 110592 BAC-клонов, которые распределены в 288 отдельных 384-луночных планшетах. Каждый из 288 отдельных 384-луночных планшетов был представлен поставщиком для одной экстракции ДНК для быстрого основанного на ПЦР скрининга. Полученная в 45 результате BAC-библиотека охватывает приблизительно 15 г. п. н. гДНК, что соответствует 12-кратному охвату генома *Brassica napus* L. сорта DH10275 (оценка генома *Brassica napus* L. составляет приблизительно 1,132 г. п. н., как описано Johnston et al. (2005), Annals of Botany 95: 229-235).

АНАЛИЗ КОДИРУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ FAD2, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВАС-БИБЛИОТЕКИ

Сконструированную ВАС-библиотеку использовали для выделения кодирующих последовательностей гена FAD2. Осуществляли эксперименты по секвенированию, чтобы идентифицировать специфичные генные последовательности четырех паралогов гена FAD2 из *Brassica napus* L. сорта DH 10275.

Сначала идентифицировали последовательность гена FAD2 у модельного вида *Arabidopsis thaliana*. Последовательность гена указана в Genbank с маркировкой локуса: At3g12120. Ранее были описаны сравнительные геномные взаимосвязи между модельным видом растения *Arabidopsis thaliana* и диплоидным *Brassica rapa*, одним из предшественников тетраплоида *Brassica napus* (Schranz et al., (2006) Trends in Plant Science 11 (11): 535-542). Конкретно в отношении гена FAD2 сравнительный анализ предполагает, что 3-4 копии гена могут встречаться в диплоидном геноме *Brassica*. Дополнительные исследования по генетическому картированию были осуществлены Scheffler et al. ((1997) Theoretical and Applied Genetics 94: 583-591). Результаты таких исследований по генетическому картированию показали, что четыре копии гена FAD2 присутствовали в *Brassica napus*.

Основанный на секвенировании анализ ВАС-библиотеки, которая была сконструирована из *B. napus* L. сорта DH 12075, привел к выделению четырех последовательностей ВАС (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4), на основании которых определяли кодирующие последовательности генов FAD2A (SEQ ID NO: 5), FAD2-1 (SEQ ID NO: 6), FAD2-2 (SEQ ID NO: 7) и FAD2-3 (SEQ ID NO: 8). Идентифицировали и генетически картировали последовательности генов FAD2A, FAD2-1, FAD2-2 и FAD2-3. Анализ последовательностей четырех генов FAD2 проводили, применяя программу выравнивания последовательностей и построение филогенетического дерева способом ближайших соседей с использованием идентичности в процентах. Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы ALIGNX® из компьютерной программы Vector NTI Advance 11.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA), и такое выравнивание показано на фиг. 1. В программе ALIGNX® использован модифицированный алгоритм Clustal W для создания выравниваний множественных последовательностей либо белка, либо последовательностей нуклеиновых кислот для сравнения сходства и для пояснения. Филогенетическое дерево, получаемое способом ближайших соседей, создавали с помощью компьютерной программы JALVIEW V2.3®, и дерево показано на фиг. 2 (Waterhouse et al. (2009), Bioinformatics 25 (9): 1189-1191). Как показано на фиг. 2, анализ изолированных последовательностей показал, что последовательности FAD2A и FAD2-3 имеют высокие уровни сходства последовательностей, и что подобным образом FAD2-1 и FAD2-2 имеют высокие уровни сходства последовательностей. Четыре последовательности могут быть отнесены к двум кладам, при этом FAD2A и FAD2-3 составляют первую кладу, а FAD2-1 и FAD2-2 составляют вторую кладу.

Затем вновь выделенные последовательности FAD2 из *Brassica napus* использовали по отношению к геномным библиотекам BLAST, выделенным из геномной ВАС-библиотеки *Brassica rapa* и ридов геномной последовательности *Brassica oleracea*, полученных методом «дробовика» (shotgun). Оба вида, *Brassica rapa* и *Brassica oleracea*, являются диплоидными предшественниками *Brassica napus*, который является амфиплоидным видом (AC-геном, n=19). *Brassica napus* возник в результате недавнего события гибридизации между *Brassica rapa* (субгеном A, n=10) и *Brassica oleracea* (субгеном C, n=9). Последовательности диплоидных предшественников сравнивали с четырьмя

разными кодирующими последовательностями FAD2, выделенными из *Brassica napus*, используя анализ BLASTn. В таком анализе последовательностей идентифицировали специфичные аннотированные генные последовательности из *Brassica rapa* и *Brassica oleracea*, которые имеют наибольшее сходство последовательностей с вновь открытymi 5 последовательностями FAD2 *Brassica napus*. В таблице 1 перечислены вновь идентифицированные кодирующие последовательности FAD2, и соответствующие номера для эталонных последовательностей предшественника, и организмы, из которых они происходят.

Таблица 1 Последовательность FAD2 <i>Brassica napus</i> и соответствующий организм-предшественник и номер доступа для родственной последовательности FAD		
Выделенная генная последовательность	Организм-предшественник и номер доступа для последовательности	
FAD2A	B.rapa	№ доступа в Genbank: KBrB063G23 (A05)
FAD2-3	B.oleracea	№ доступа в Genbank: GSS23580801*
FAD2-1	B.rapa	№ доступа в Genbank: KBrB130I19
FAD2-2	B.oleracea	№ доступа в Genbank: GSS 17735412

* Вход к последовательности в Genbank скорректирован

Гены FAD2 существуют в геноме *Brassica napus* в виде двух копий каждого гена на субгеном. Одна копия каждого гена локализована в субгеноме А, и подобным образом одна копия каждого гена локализована в субгеноме С. Описаны новые правила 20 присвоения названия так, чтобы указать, в каком субгеноме локализован каждый ген. Высокие уровни сходства последовательностей между четырьмя разными кодирующими последовательностями FAD2, выделенными из ВАС-библиотеки геномной ДНК *Brassica napus*, и данными о последовательностях предшественников свидетельствуют о том, что FAD2-3 является дубликатом последовательности FAD2 из субгенома С и может 25 быть переименована как FAD2C; FAD2-1 является дубликатом последовательности FAD2 из субгенома А и поэтому может быть обозначена как FAD2A'; и наконец, FAD2-2 является второй копией, которая дуплицирована с последовательности FAD2 субгенома С и может быть обозначена как FAD2C'.

АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ КОДИРУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ FAD3, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВАС-БИБЛИОТЕКИ

Сконструированную ВАС-библиотеку использовали для выделения кодирующих последовательностей гена FAD3. Проводили эксперименты по секвенированию, чтобы идентифицировать конкретные генные последовательности пяти паралогов гена FAD3 из *Brassica napus* L. сорта DH10275.

Последовательность гена FAD3 сначала идентифицировали в модельном виде *Arabidopsis thaliana*. Последовательность гена указана в Genbank с маркировкой локуса: At2g29980. Ранее были описаны сравнительные геномные взаимосвязи между модельным видом растения *Arabidopsis thaliana* и диплоидным *Brassica rapa*, одним из предшественников тетраплоида *Brassica napus* (Schranz et al. (2006), Trends in Plant Science 40 11 (11): 535-542). Конкретно в отношении гена FAD сравнительный анализ предполагает, что 3-4 копии гена могут встречаться в диплоидном геноме *Brassica*. Дополнительные исследования по генетическому картированию были осуществлены Scheffler et al. ((1997) Theoretical and Applied Genetics 94: 583-591). Результаты таких исследований по генетическому картированию показали, что шесть копий гена FAD3 присутствовали в 45 *Brassica napus*.

Предыдущие попытки секвенирования, сфокусированные на генах FAD3 из *Brassica napus*, привели к идентификации и генетическому картированию специфичных копий обоих геномов А и С (Hu et al. (2006) Theoretical and Applied Genetics, 113(3): 497-507).

Ранее была сконструирована и секвенирована коллекция EST-последовательностей из специфичных для семян библиотек кДНК для линии растений DH 12075 Andrew Sharpe, Agriculture and Agri-food Canada, 107 Science Place, Saskatoon, Saskatchewan. Что касается коллекции EST из растения канолы DH 12075 с двумя гаплоидными наборами, то не было полноразмерных последовательностей, кроме того также не было данных о 5 качестве последовательностей и достоверности правильно названных нуклеотидов. Следовательно, вариации последовательностей между разными ридами последовательностей гена FAD нельзя было однозначно отнести к разными копиям генов разных паралогов семейства генов FAD3, не была доступна геномная 10 последовательность. Однако когда осуществляли комбинированный анализ последовательностей с использованием EST, а также двух полноразмерных последовательностей генов FAD3A и FAD3C, описанных Hu et al. (2006), идентифицировали EST, которые соответствовали обоим генам, наряду с 3 дополнительными гаплотипами. В результате идентифицировали всего шесть 15 уникальных гаплотипов FAD3. После сбора всех имеющихся данных о различных гаплотипах FAD3 идентифицировали высокие уровни дивергенции экзонных последовательностей в экзоне 1. Дивергенцию последовательности FAD3 в экзоне 1 расценили как возможность, которую можно использовать для конструирования специфичных для гена/аллеля ПЦР-праймеров. Кроме того, идентифицировали экзоны, 20 которые либо имели минимальные различия в гаплотипах (например, экзоны 5, 6, 7 и 8 имели 1-3 п. н., которые варьировали в FAD3A и FAD3C), либо не имели изменений в последовательности (например, экзоны 2 и 3).

Анализ по определению последовательностей BAC-библиотеки, которая была сконструирована для *B. napus* L. сорта DH 12075, привел к выделению шести BAC- 25 последовательностей (SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14), на основании которых были определены кодирующие последовательности генов FAD3A (SEQ ID NO: 15), FAD3A' (SEQ ID NO: 16), FAD3A'' (SEQ ID NO: 17), FAD3C (SEQ ID NO: 18), FAD3C'' (SEQ ID NO: 19) и FAD3C (SEQ ID NO: 20). Были идентифицированы и генетически картированы последовательности 30 генов FAD3A, FAD3A', FAD3A'', FAD3C, FAD3C'' и FAD3C.

Анализ последовательностей шести генов FAD3 проводили, применяя программу выравнивания последовательностей и построение филогенетического дерева способом ближайших соседей с использованием идентичности в процентах. Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы ALIGNX® из компьютерной 35 программы Vector NTI Advance 11.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA), и такое выравнивание показано на фиг. 3. В программе ALIGNX® использован модифицированный алгоритм Clustal W для создания выравниваний множественных последовательностей либо белка, либо последовательностей нукleinовых кислот для сравнения сходства и для аннотации. Филогенетическое дерево, получаемое способом ближайших соседей, создавали с помощью компьютерной программы JALVIEW V2.3®, 40 и дерево показано на фиг. 4 (Waterhouse et al. (2009), Bioinformatics 25 (9): 1189-1191). Идентифицированные контиги, которые содержали гены FAD3, использовали в качестве BLASTn-запросов для базы данных генов *Arabidopsis thaliana*. Область каждого из 6 контигов, содержащую ген FAD3, идентифицировали путем сравнения с геном FAD3 45 *Arabidopsis thaliana* (№ доступа в Genbank: At2g29980). Затем контиги FAD3 ориентировали таким образом, чтобы все гены FAD3 были в 5'-3'-ориентации. Контиги FAD3 урезали так, чтобы они содержали не более 2 вышерасположенных (5') и 1 нижерасположенного (3') гена *Arabidopsis thaliana*, где это было возможно. После ориентирования была

извлечена полная кодирующая область генов FAD3 из каждого контига и использована для создания древа способом ближайших соседей, чтобы отобразить взаимосвязь между разными представителями семейства генов FAD3. 6 представителей семейства FAD3 были объединены в 3 пары генов FAD3 (фиг.4).

⁵ СКРИНИНГ НА ОСНОВЕ ПЦР

Конструировали группу ПЦР-праймеров для скрининга вышеуказанной ВАС-библиотеки. Праймеры конструировали либо в виде универсальных праймеров, которые могут амплифицировать всех представителей семейства генов, либо в виде геноспецифичных праймеров для целенаправленной амплификации аллелей. ПЦР-

¹⁰ праймеры конструировали так, чтобы они имели длину 20 п. н. (± 1 п. н.) и имели содержание G/C 50% ($\pm 8\%$). В таблице 2 и таблице 3 перечислены праймеры, которые были сконструированы и синтезированы. Клоны ВАС-библиотеки объединяли подвергали скринингу с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

¹⁵ Таблица 2
Последовательности праймеров, используемых для ПЦР-амплификации последовательностей FAD3

Название праймера:	SEQ ID NO:	Последовательность:
D_uni_F3_F1	SEQ ID NO:21	GAATAAGCCATCGGACACAC
D_spec_F3_F2	SEQ ID NO:22	ATGCGAACGGAGACGAAAGG
D_spec_F3_F3	SEQ ID NO:23	TGTTAACGGAGATTCCGGTG
²⁰ D_spec_F3_F4	SEQ ID NO:24	GTAAGCAATGTGAACGGAGAT
D_uni_F3_R1	SEQ ID NO:25	CAGTGTATCTGAGCATCCG
D_spec_F3_R2	SEQ ID NO:26	GTGGCCGAGTACGAAGATAG
D_spec_F3_R3	SEQ ID NO:27	CAGTAGAGTGGCCAGAGGA

²⁵ Таблица 3
Последовательности ПЦР-праймеров, сконструированных для скрининга ВАС-библиотеки в отношении идентификации генов FAD2

Название праймера	SEQ ID NO:	Последовательность
D_UnivF2_F1	SEQ ID NO:28	ATGGGTGCAGGTGGAAGAATG
D_UnivF2_F2	SEQ ID NO:29	AGCGTCTCCAGATATACATC
D_UnivF2_R1	SEQ ID NO:30	ATGTATATCTGGAGACGCTC
³⁰ D_UnivF2_R2	SEQ ID NO:31	TAGATACACTCCTTCGCCCTC
D_SpecificF2_F3	SEQ ID NO:32	TCTTCTCCACCTCATCTG
D_SpecificF2_R3	SEQ ID NO:33	TTCGTAGCTTCCATCGCGTG
D_UnivF2_F4	SEQ ID NO:34	GACGCCACCATTCCAACAC
D_UnivF2_R4	SEQ ID NO:35	ACTTGCCGTACCACTTGATG

³⁵ Использовали два разных набора условий для полимеразных цепных реакций (ПЦР). Первую серию ПЦР-реакций проводили в следующих условиях: 1x буфер для ПЦР (содержащий dNTP); 1,5 mM MgCl₂; 200 мкМ 0,25 Ед ДНК-полимеразы IMMOLASE® (Bioline, London, UK); 250 нМ каждого праймера; и примерно 5-10 нг матричной ДНК. Вторая серия ПЦР-реакций была разработана для амплификации геномной ДНК, и ⁴⁰ реакционная смесь содержала: 5-10 нг геномной ДНК, 1x буфер для ПЦР, 2 mM dNTP, 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров, и 0,25 Ед ДНК-полимеразы IMMOLASE® (Bioline, London, UK). Смеси для амплификации объединяли в конечном объеме мкл и амплифицировали, используя термоциклер MJ PTC200® (BioRad, Hercules, CA) или систему ABI 9700 GENE AMP SYSTEM® (Life Technologies, Carlsbad, CA). Основанный на ПЦР скрининг конкретных планшетов проводили, используя способ четырехмерного скрининга на основе системы скрининга, описанной Vgyan et al. (Scottish Crops Research Institute annual report: 2001-2002), и описанные выше условия для ПЦР. После основанного на ПЦР скрининга объединенных ВАС-библиотек амплифицированный ПЦР-продукт

секвенировали, используя способ прямого секвенирования по Сэнгеру.

Амплифицированные продукты очищали, используя этанол, ацетат натрия и EDTA, следуя протоколу BIGDYE® V3.1 (Applied Biosystems), и осуществляли электрофорез на автоматизированной платформе для капиллярного электрофореза ABI3730x1®.

5 После основанного на ПЦР скрининга и конформационного секвенирования по Сэнгеру идентифицировали набор планшетов, которые содержали различные представители семейства генов FAD2 и FAD3. Всего идентифицировали четыре уникальных последовательности паралогичных генов FAD2 и FAD3 (таблица 4 и таблица 5). Было выбрано всего по два планшета для каждой последовательности паралогичных
10 генов FAD2 и FAD3, чтобы подвергнуть скринингу планшетов с целью идентификации конкретной лунки и клона в планшете, который содержал ген FAD2 и FAD3 (таблица 4 и таблица 5). Конкретные лунки идентифицировали в обоих планшетах, и отбирали отдельный клон для каждого из представителей семейств генов FAD2 и FAD3.

Таблица 4				
Идентификация планшетов с BAC-клонами, которые дают позитивную реакцию с подробно указанными сочетаниями ПЦР-праймеров, а также два идентифицированных планшета, которые были взяты для последующей идентификации клонов в пределах планшета				
Название гена	Наборы праймеров	Пулы позитивных планшетов	Выбранные планшеты	ID лунки
FAD2A	F4+R1, F1+R1, F1+R4, F3+R3	8, 27, 30, 83, 109, 147, 180, 199, 209, 251, 288	Планшет 199 Планшет 27	L23 D20
FAD2-1	F1+R4, F4+R1, F1+R1, F2+R2	12, 89, 123, 148, 269	Планшет 123 Планшет 148	N17 B15
FAD2-2	F4+R1, F1+R1, F1+R4, F2+R2	24, 44, 46, 47, 80, 91, 104, 110, 119, 121, 124, 248	Планшет 44 Планшет 121	H03 A17
FAD2-3	F1+R4, F4+R1, F1+R1, F3+R3	8, 62, 113, 205, 276	Планшет 62 Планшет 205	I16 K11

Таблица 5				
Идентификация планшетов с BAC-клонами, которые дают позитивную реакцию с подробно указанными сочетаниями ПЦР-праймеров, а также два идентифицированных планшета, которые были взяты для последующей идентификации клонов в пределах планшета				
Название гена	Наборы праймеров	Пулы позитивных планшетов	Выбранные планшеты	
FAD3A (FAD3A-1)	F2+R2	16, 231	Планшет 16 Планшет 231	
FAD3C	F4+R2	18, 27, 136, 178, 211, 232	Планшет 18 Планшет 27	
FAD3C" (Гаплотип1)	F4+R2, F4+R3, F3+R3	23, 44, 53, 56, 77, 116, 158, 199, 209, 278, 280, 282, 283, 284, 286	Планшет 44 Планшет 199	
FAD3A' (FAD3A'/FAD3A")	F4+R2	52, 121, 139	Планшет 121 Планшет 139	
FAD3C' (Гаплотип2)	F4+R2	144, 188, 235	Планшет 144 Планшет 188	
FAD3A" (Гаплотип3)	F4+R3 и F3+R3	69, 105, 106, 229, 242, 247, 248	Планшет 69 Планшет 106	

25 Отдельный BAC-клон для каждого идентифицированного представителя семейства генов FAD дополнительно анализировали путем секвенирования. ДНК выделяли из BAC-клона и готовили для секвенирования с использованием набора LARGE CONSTRUCT KIT® (Qiagen, Valencia, CA), следуя инструкциям производителя.
30 Экстрагированную BAC-ДНК подготавливали для секвенирования, используя методику GS-FLX® Titanium (Roche, Indianapolis, IN), следуя инструкциям производителя. Реакции секвенирования осуществляли, используя физически разделенный на секторы планшет для пико-титрования GS-FLX TI®, при этом BAC объединяли в пары для получения оптимальных данных. BAC объединяли в пары, при этом ген FAD2 объединяли в паре с геном FAD3. Все полученные данные о последовательностях собирали, используя NEWBLER V2.0.01.14® (454 Life Sciences, Branford, CT). Собранные контиги оценивали 40 вручную в отношении присутствия соответствующего гена FAD, используя SEQUENCHER V3.7® (GeneCodes, Ann Arbor, MI).

45 После того, как была идентифицирована и полностью охарактеризована полная геномная последовательность всех четырех генов FAD2 и шести генов FAD3, конструировали нуклеазы с цинковыми пальцами для связывания с

последовательностями каждого конкретного представителя семейства генов.

ПРИМЕР 2: КОНСТРУИРОВАНИЕ СВЯЗЫВАЮЩИХ ДОМЕНОВ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ, СПЕЦИФИЧНЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К ГЕНАМ FAD2

Белки цинковых пальцев, направленные против последовательностей ДНК,

- 5 кодирующих различные функциональные последовательности локуса гена FAD2, конструировали, как описано ранее. См., например, публикацию Urnov et al. (2005) (Nature 435: 646-651). Примеры последовательности-мишени и спиралей для распознавания показаны в таблице 6 и таблице 8 (конструкции областей спиралей распознавания) и таблице 7 и таблице 9 (сайты-мишени). В таблице 8 и таблице 9
- 10 нуклеотиды в сайте-мишени, с которыми контактируют спирали распознавания ZFP, указаны заглавными буквами; не подвергаемые контакту нуклеотиды указаны строчными буквами. Были сконструированы сайты-мишени нуклеаз с цинковыми пальцами (ZFN) так, чтобы связать пять сайтов-мишеней FAD2A и семь сайтов-мишеней FAD3. Конструкции цинковых пальцев FAD2 и FAD3 были включены в векторы
- 15 экспрессии цинковых пальцев, кодирующие белок, имеющий по меньшей мере один палец со структурой ССНС. См. публикацию патента США № 2008/0182332. В частности, последний палец в каждом белке имел остов ССНС для спирали распознавания. Неканонические последовательности, кодирующие цинковые пальцы,сливали с нуклеазным доменом фермента рестрикции типа IIS FokI (аминокислоты 384-579
- 20 последовательности, описанной Wah et al. (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10564-10569) через состоящий из четырех аминокислот линкер ZC и сигналом ядерной локализации oраque-2, полученным из Zea mays, получая нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN) для FAD2A. Экспрессия слитых белков была под контролем относительно сильного конститутивного промотора, такого как промотор, полученный из промотора
- 25 вируса мозаики прожилок маниока (CsVMV) и фланкированный 3'-нетранслируемой областью ORF23 Agrobacterium tumefaciens (AtuORF23 3'UTR v1). Добавляли самогидролизующуюся кодирующую нуклеотидную последовательность 2A из вируса Thosea asigna (Szymczak et al., 2004) между двумя слитыми белками нуклеаз с цинковыми пальцами, которые клонировали в конструкции. Примеры векторов описаны ниже.
- 30 Оптимальные цинковые пальцы подтверждали в отношении активности расщепления, используя систему на основе почекущихся дрожжей, описанную ранее для идентификации активных нуклеаз. См., например, публикацию патента США № 20090111119; публикации Doyon et al. (2008) (Nat. Biotechnol. 26: 702-708), Geurts et al. (2009) (Science 325: 433). Цинковые пальцы для различных функциональных доменов
- 35 отбирали для применения *in-vivo*. Из множества ZFN, которые были сконструированы, получены и тестированы в отношении связывания с предполагаемыми сайтами-мишениями геномного полинуклеотида FAD, были идентифицированы ZFN, обладающие активностью *in vivo* активность на высоких уровнях и отобраны для дальнейших экспериментов. Такие ZFN были охарактеризованы как способные эффективно
- 40 связываться и расщеплять уникальные сайты-мишени геномных полинуклеотидов FAD2 *in planta*.

Таблица 6 Конструкции цинковых пальцев FAD3
--

ZFP	F1	F2	F3	F4	F5	F6
27961	<u>RSDNLAR</u> (SEQ ID NO: 178)	QKKDRSY (SEQ ID NO:179)	<u>RSDNLAR</u> (SEQ ID NO:180)	<u>QRGNRNT</u> (SEQ ID NO:181)	<u>RSDHLSR</u> (SEQ ID NO:182)	<u>RNQDRTN</u> (SEQ ID NO:183)
27962	<u>DRSNLSR</u> (SEQ ID NO:184)	<u>RQDSRSQ</u> (SEQ ID NO:185)	<u>QSSDLSR</u> (SEQ ID NO:186)	<u>DRSALAR</u> (SEQ ID NO:187)	<u>TSGSLTR</u> (SEQ ID NO:188)	N/A
27973	<u>QSSDLSR</u> (SEQ ID NO:189)	<u>AASNRSK</u> (SEQ ID NO:190)	<u>TSGSLSR</u> (SEQ ID NO:191)	<u>RSDALAR</u> (SEQ ID NO:192)	<u>RSDVLST</u> (SEQ ID NO:193)	<u>WGRLRKL</u> (SEQ ID NO:194)
27974	<u>ERGTLAR</u> (SEQ ID NO:195)	<u>RSDDLTR</u> (SEQ ID NO:196)	<u>RSDHLSA</u> (SEQ ID NO:197)	<u>QHGALQT</u> (SEQ ID NO:198)	<u>TSGNLTR</u> (SEQ ID NO:199)	<u>QSGHLSR</u> (SEQ ID NO:200)
27987	<u>TSGSLTR</u> (SEQ ID NO:201)	<u>RSDHLSQ</u> (SEQ ID NO:202)	<u>CTRNWRW</u> (SEQ ID NO:203)	<u>RSDNLSE</u> (SEQ ID NO:204)	<u>ASKTRKN</u> (SEQ ID NO:205)	N/A
27990	<u>TSGSLSR</u> (SEQ ID NO:206)	<u>TSSNRAV</u> (SEQ ID NO:207)	<u>TSGNLTR</u> (SEQ ID NO:208)	<u>DRSALAR</u> (SEQ ID NO:209)	<u>RSDVLSE</u> (SEQ ID NO:210)	<u>RNFSLTM</u> (SEQ ID NO:211)
27991	<u>QSGDLTR</u> (SEQ ID NO:212)	<u>TSGSLSR</u> (SEQ ID NO:213)	<u>QSGNLAR</u> (SEQ ID NO:214)	<u>TSGSLSR</u> (SEQ ID NO:215)	<u>QSGSLTR</u> (SEQ ID NO:216)	N/A
27992	<u>DRSHLAR</u> (SEQ ID NO:217)	<u>TSGSLSR</u> (SEQ ID NO:218)	<u>TSSNRAV</u> (SEQ ID NO:219)	<u>TSGNLTR</u> (SEQ ID NO:220)	<u>DRSALAR</u> (SEQ ID NO:221)	N/A
28004	<u>QSGNLAR</u> (SEQ ID NO:222)	<u>HLGNLKT</u> (SEQ ID NO:223)	<u>RSDHLSQ</u> (SEQ ID NO:224)	<u>TARLLKL</u> (SEQ ID NO:225)	<u>QSGNLAR</u> (SEQ ID NO:226)	<u>QTSHLPQ</u> (SEQ ID NO:227)
28005	<u>RSDNLSV</u> (SEQ ID NO:228)	<u>TSGHLSR</u> (SEQ ID NO:229)	<u>TSGSLTR</u> (SEQ ID NO:230)	<u>RSDALST</u> (SEQ ID NO:231)	<u>DRSTRTK</u> (SEQ ID NO:232)	N/A
28021	<u>QNAHRKT</u> (SEQ ID NO:233)	<u>TSGNLTR</u> (SEQ ID NO:234)	<u>LKQMLAV</u> (SEQ ID NO:235)	<u>RSDNLSE</u> (SEQ ID NO:236)	<u>DNSNRKT</u> (SEQ ID NO:237)	N/A
28022	<u>RSDNLSV</u> (SEQ ID NO:238)	<u>QNANRIT</u> (SEQ ID NO:239)	<u>TSGSLSR</u> (SEQ ID NO:240)	<u>QSSVRNS</u> (SEQ ID NO:241)	<u>DRSALAR</u> (SEQ ID NO:242)	N/A
28023	<u>RSDNLSE</u> (SEQ ID NO:243)	<u>DNSNRKT</u> (SEQ ID NO:244)	<u>DRSNLTR</u> (SEQ ID NO:245)	<u>RSDVLSE</u> (SEQ ID NO:246)	<u>TRNGLKY</u> (SEQ ID NO:247)	N/A
28024	<u>RSDALAR</u> (SEQ ID NO:248)	<u>RSDVLSE</u> (SEQ ID NO:249)	<u>RSSDRTK</u> (SEQ ID NO:250)	<u>RSDNLSE</u> (SEQ ID NO:251)	<u>QNANRIT</u> (SEQ ID NO:252)	N/A
28025	<u>QSSDLSR</u> (SEQ ID NO:253)	<u>QSTHRNA</u> (SEQ ID NO:254)	<u>RSDNLAR</u> (SEQ ID NO:255)	<u>QRGNRNT</u> (SEQ ID NO:256)	<u>RSDHLSR</u> (SEQ ID NO:257)	<u>RNQDRTN</u> (SEQ ID NO:258)

	28026	<u>DRSNLSR</u> (SEQ ID NO:259)	<u>RQDSRSQ</u> (SEQ ID NO:260)	<u>QSSDLSR</u> (SEQ ID NO:261)	<u>DRSALAR</u> (SEQ ID NO:262)	<u>TSGSLTR</u> (SEQ ID NO:263)	N/A
5	28035	<u>QSSDLSR</u> (SEQ ID NO:264)	<u>AASNRSK</u> (SEQ ID NO:265)	<u>TSGSLSR</u> (SEQ ID NO:266)	<u>RSDALAR</u> (SEQ ID NO:267)	<u>RSDTLSQ</u> (SEQ ID NO:268)	<u>QRDHRIK</u> (SEQ ID NO:269)
10	28036	<u>RSDDLTR</u> (SEQ ID NO:270)	<u>QSSDLRR</u> (SEQ ID NO:271)	<u>RSDHLSA</u> (SEQ ID NO:272)	<u>QHGALQT</u> (SEQ ID NO:273)	<u>TSGNLTR</u> (SEQ ID NO:274)	<u>QSGHLSR</u> (SEQ ID NO:275)
15	28039	<u>TSGSLSR</u> (SEQ ID NO:276)	<u>RSDALAR</u> (SEQ ID NO:277)	<u>RSDTLSQ</u> (SEQ ID NO:278)	<u>QRDHRIK</u> (SEQ ID NO:279)	<u>TSGNLTR</u> (SEQ ID NO:280)	<u>DRGDLRK</u> (SEQ ID NO:281)
20	28040	<u>DSSDRKK</u> (SEQ ID NO:282)	<u>TSGNLTR</u> (SEQ ID NO:283)	<u>DNYNRAK</u> (SEQ ID NO:284)	<u>DRSHLTR</u> (SEQ ID NO:285)	<u>RSNLTT</u> (SEQ ID NO:286)	N/A
25	28051	<u>RSDNLSN</u> (SEQ ID NO:287)	<u>TSSSRIN</u> (SEQ ID NO:288)	<u>RSDNLSE</u> (SEQ ID NO:289)	<u>ASKTRKN</u> (SEQ ID NO:290)	<u>RSDALTQ</u> (SEQ ID NO:291)	N/A
30	28052	<u>RSDTLST</u> (SEQ ID NO:292)	<u>DRSSRIK</u> (SEQ ID NO:293)	<u>RSDDLSK</u> (SEQ ID NO:294)	<u>DNSNRIK</u> (SEQ ID NO:295)	N/A	N/A
	28053	<u>QSSDLSR</u> (SEQ ID NO:296)	<u>QAGNLSK</u> (SEQ ID NO:297)	<u>QSGDLTR</u> (SEQ ID NO:298)	<u>TSGSLSR</u> (SEQ ID NO:299)	<u>QSGNLAR</u> (SEQ ID NO:300)	N/A
	28054	<u>TSGSLSR</u> (SEQ ID NO:301)	<u>LRQTLRD</u> (SEQ ID NO:302)	<u>TSGNLTR</u> (SEQ ID NO:303)	<u>DRSALAR</u> (SEQ ID NO:304)	<u>RSDVLSE</u> (SEQ ID NO:305)	<u>RNFSLTM</u> (SEQ ID NO:306)
	28055	<u>QSGDLTR</u> (SEQ ID NO:307)	<u>TSGSLSR</u> (SEQ ID NO:308)	<u>QSGNLAR</u> (SEQ ID NO:309)	<u>TSGSLSR</u> (SEQ ID NO:310)	<u>QSGSLTR</u> (SEQ ID NO:311)	N/A
	28056	<u>DRSHLAR</u> (SEQ ID NO:312)	<u>TSGSLSR</u> (SEQ ID NO:313)	<u>LRQTLRD</u> (SEQ ID NO:314)	<u>TSGNLTR</u> (SEQ ID NO:315)	<u>DRSALAR</u> (SEQ ID NO:316)	N/A

N/A – не анализировали

Таблица 7
Сайты-мишени цинковых пальцев FAD3

ZFP	Сайт-мишень (5'-3')	SEQ ID NO:
27961	cgCCGGAGAAAGAGAGAGAGtttgagg	SEQ ID NO:36
27962	tgGTTGTCGCTATGGACcagcgtagcaa	SEQ ID NO:37
27969	tcTCCGTTeGCATTGcTACGCTggtcca	SEQ ID NO:38
27970	gaAAGGTTtGATCCGAGCGCAacaaccac	SEQ ID NO:39
27973	ctTGAACGGTGGTTgTGCCTCtcggatca	SEQ ID NO:40
27974	tcGGAGATATAAGGGCGGCCattctcta	SEQ ID NO:41
27987	taGCCAGAACAGGGTTccctggccgc	SEQ ID NO:42
27988	ctTCGTACTCGGCCACGactggtaattt	SEQ ID NO:43
27989	ttGAAGTTGCAaTAAGCTtctctcgct	SEQ ID NO:44
27990	acTTGCTGGTCGATCATGTTggccactc	SEQ ID NO:45
27991	aaGTAGTTGAAGTTGCAataagcttct	SEQ ID NO:46
27992	tgGTCGATCATGTTGGCCactcttgtt	SEQ ID NO:47
28004	aaCGAGAATGAAGGAATGAAGaatatga	SEQ ID NO:48
28005	atACCATGGTTGGTAAGtcattttttt	SEQ ID NO:49
28021	ccAACGAGgAATGATAGAtaaacaagag	SEQ ID NO:50
28022	caGTCACAGTTcTAAAAGtctatgggt	SEQ ID NO:51

28023	tgTGACTGGACcAACGAGgaatgataga	SEQ ID NO:52
28024	tcTAAAAGTCTATGGTGttccctacatt	SEQ ID NO:53
28025	cgCCGGAGAAAAGAGAGAGCTttagggaa	SEQ ID NO:54
28026	tgGTTGTCGCTATGGACcagcgtagcaa	SEQ ID NO:55
28035	ctTAAACGGTGGTTgTGCCTCtggatca	SEQ ID NO:56
28036	tcGGAGATATAAAGGGCTGCGGatccctaa	SEQ ID NO:57
28039	tcTCCGATctTAAACGGTGGTTgtgcgc	SEQ ID NO:58
28040	atAAGGGCTGCGATTCCtaaggatttttt	SEQ ID NO:59
28051	agATGGCCCAGAAAAGGgttcctgggc	SEQ ID NO:60
28052	cgTACTCGGCCACGactggtaatttaat	SEQ ID NO:61
28053	ttGAAGTTGCAaTAAGCTttctctcgct	SEQ ID NO:62
28054	acTTGCTGGTCGATCGTGTGTTggccactc	SEQ ID NO:63
28055	aaGTAGTTGAAGTTGCAataagttttct	SEQ ID NO:64
28056	tgGTCGATCGTGTGGCacttttgtt	SEQ ID NO:65

Таблица 8
Конструкции цинковых пальцев FAD2

15

20

25

30

35

40

45

ZFP	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
5	24800	<u>RSDNLST</u> (SEQ ID NO:317)	<u>HSHARIK</u> (SEQ ID NO:318)	<u>HRSSLRR</u> (SEQ ID NO:319)	<u>RSDHLSE</u> (SEQ ID NO:320)	<u>QANANRIT</u> (SEQ ID NO:321)	N/A
10	24801	<u>DRSNLSR</u> (SEQ ID NO:322)	<u>HRSSLRR</u> (SEQ ID NO:323)	<u>TSGNLTR</u> (SEQ ID NO:324)	<u>MSHHLRD</u> (SEQ ID NO:325)	<u>DQSNLRA</u> (SEQ ID NO:326)	N/A
15	24794	<u>QSGNLAR</u> (SEQ ID NO:327)	<u>RSDNLSR</u> (SEQ ID NO:328)	<u>DNNARIN</u> (SEQ ID NO:329)	<u>DRSNLSR</u> (SEQ ID NO:330)	<u>RSDHLTQ</u> (SEQ ID NO:331)	N/A
20	24795	<u>RSDNLRE</u> (SEQ ID NO:332)	<u>QSGALAR</u> (SEQ ID NO:333)	<u>QSGNLAR</u> (SEQ ID NO:334)	<u>RSDVLSE</u> (SEQ ID NO:335)	<u>SPSSRRT</u> (SEQ ID NO:336)	N/A
25	24810	<u>RSDSLSR</u> (SEQ ID NO:337)	<u>RKDARIT</u> (SEQ ID NO:338)**	<u>RSDHLSA</u> (SEQ ID NO:339)**	<u>WSSSLYY</u> (SEQ ID NO:340)**	<u>NSRNLRN</u> (SEQ ID NO:341)**	N/A
30	24811	<u>DQSTLRN</u> (SEQ ID NO:342)	<u>DRSNLSR</u> (SEQ ID NO:343)	<u>DRSNLWR</u> (SEQ ID NO:344)	<u>DRSALSR</u> (SEQ ID NO:345)	<u>RSDALAR</u> (SEQ ID NO:346)	N/A
35	24814	<u>RSDALSR</u> (SEQ ID NO:347)	<u>DRSDLSR</u> (SEQ ID NO:348)	<u>RSDHLTQ</u> (SEQ ID NO:349)	<u>QSGALAR</u> (SEQ ID NO:350)	<u>QSGNLAR</u> (SEQ ID NO:351)	N/A
40	24815	<u>DRSNLSR</u> (SEQ ID NO:352)	<u>DSSARNT</u> (SEQ ID NO:353)	<u>DRSSRKR</u> (SEQ ID NO:354)	<u>QSGDLTR</u> (SEQ ID NO:355)	<u>LAHHLVQ</u> (SEQ ID NO:356)	N/A
45	24818	<u>RSDNLST</u> (SEQ ID NO:357)	<u>HSHARIK</u> (SEQ ID NO:358)	<u>TSGHLSR</u> (SEQ ID NO:359)	<u>RSDNLSV</u> (SEQ ID NO:360)	<u>IRSTLRD</u> (SEQ ID NO:361)	N/A
	24819	<u>TSGHLSR</u> (SEQ ID NO:362)	<u>DRSNLSR</u> (SEQ ID NO:363)	<u>HRSSLRR</u> (SEQ ID NO:364)	<u>TSGNLTR</u> (SEQ ID NO:365)	<u>MSHHLRD</u> (SEQ ID NO:366)	N/A
	24796	<u>RSDALSR</u> (SEQ ID NO:367)	<u>DRSDLSR</u> (SEQ ID NO:368)	<u>RSDHLTQ</u> (SEQ ID NO:369)	<u>QSGALAR</u> (SEQ ID NO:370)	<u>QSGNLAR</u> (SEQ ID NO:371)	N/A
	24797	<u>RSAVLSE</u> (SEQ ID NO:372)	<u>TNSNRIT</u> (SEQ ID NO:373)	<u>LKQHLNE</u> (SEQ ID NO:374)	<u>QSGALAR</u> (SEQ ID NO:375)	<u>QSGNLAR</u> (SEQ ID NO:376)	N/A
	24836	<u>DRSNLSR</u> (SEQ ID NO:377)	<u>QSGDLTR</u> (SEQ ID NO:378)	<u>QSGALAR</u> (SEQ ID NO:379)	<u>DRSNLSR</u> (SEQ ID NO:380)	<u>ORTHLTQ</u> (SEQ ID NO:381)	N/A
	24837	<u>RSDNLSN</u> (SEQ ID NO:382)	<u>TNSNRIK</u> (SEQ ID NO:383)	<u>QSSDLSR</u> (SEQ ID NO:384)	<u>QSSDLRR</u> (SEQ ID NO:385)	<u>DRSNRIK</u> (SEQ ID NO:386)	N/A
	24844	<u>RSANLAR</u> (SEQ ID NO:387)	<u>RSDNLTT</u> (SEQ ID NO:388)	<u>QSGETIN</u> (SEQ ID NO:389)	<u>RSADLSR</u> (SEQ ID NO:390)	<u>RSDNLSE</u> (SEQ ID NO:391)	<u>DRSHLAR</u> (SEQ ID NO:392)

	24845	<u>DRSHLAR</u> (SEQ ID NO:393)	<u>RSDNLSE</u> (SEQ ID NO:394)	<u>SKOYLIK</u> (SEQ ID NO:395)	<u>ERGTLAR</u> (SEQ ID NO:396)	<u>RSDHLTT</u> (SEQ ID NO:397)	N/A
5	24820	<u>QSGALAR</u> (SEQ ID NO:398)	<u>OSGNLAR</u> (SEQ ID NO:399)	<u>DRSHLAR</u> (SEQ ID NO:400)	<u>DRSDLSR</u> (SEQ ID NO:401)	<u>RSDNLTR</u> (SEQ ID NO:402)	N/A
10	24821	<u>DRSHLAR</u> (SEQ ID NO:403)	<u>RSDNLSE</u> (SEQ ID NO:404)	<u>SKOYLIK</u> (SEQ ID NO:405)	<u>ERGTLAR</u> (SEQ ID NO:406)	<u>RSDHLTT</u> (SEQ ID NO:407)	N/A
15	24828	<u>DRSDLSR</u> (SEQ ID NO:408)	<u>RSDNLTR</u> (SEQ ID NO:409)	<u>QRTHLTQ</u> (SEQ ID NO:410)	<u>RSDNLSE</u> (SEQ ID NO:411)	<u>ASKTRKN</u> (SEQ ID NO:412)	N/A
20	24829	<u>RSDTLSE</u> (SEQ ID NO:413)	<u>QSHNRTK</u> (SEQ ID NO:414)	<u>QSDHLTQ</u> (SEQ ID NO:415)	<u>RSSDLSR</u> (SEQ ID NO:416)	<u>QSSDLSR</u> (SEQ ID NO:417)	<u>RSDHLTQ</u> (SEQ ID NO:418)
25	24832	<u>RSDSLSR</u> (SEQ ID NO:419)	<u>RKDARIT</u> (SEQ ID NO:420)	<u>DRSHLSR</u> (SEQ ID NO:421)	<u>QSGNLAR</u> (SEQ ID NO:422)	<u>QSSDLSR</u> (SEQ ID NO:423)	<u>DRSALAR</u> (SEQ ID NO:424)
30	24833	<u>RSDDLSK</u> (SEQ ID NO:425)	<u>RSDTRKT</u> (SEQ ID NO:426)	<u>DRSNLSR</u> (SEQ ID NO:427)	<u>DRSNLWR</u> (SEQ ID NO:428)	<u>RSDSLSR</u> (SEQ ID NO:429)	<u>NNDHRK</u> (SEQ ID NO:430)
35							N/A – не анализировали

Таблица 9
Сайты-мишени цинковых пальцев FAD2

ZFP	№ плазмиды	Сайт-мишень (5'-3')	Сайт-мишень/связывающий сайт ZFP, присутствующий в последовательности SEQ ID NO:
24800	pDAB104001	ccCAAAGGGTGTGAGgtacttgcgt	SEQ ID NO:66
24801	pDAB104001	cgCACCGTGATGTTAACggttcagtca	SEQ ID NO:67
24794	pDAB104002	taAGGGACGAGGGAGGAAGggatggagaaga	SEQ ID NO:68
24795	pDAB104002	ttCTCCTGGAAGTACAGGtcatcgacgccc	SEQ ID NO:69
24810	pDAB104003	gtCGCTGAAGGcGTGGTGGccgcactcg	SEQ ID NO:70
24811	pDAB104003	caGTGGCTgACGACACCgtggccctca	SEQ ID NO:71
24814	pDAB104004	gaGAAGTAAGGGACGAGggagaaggagt	SEQ ID NO:72
24815	pDAB104004	gaAGTACAGTCATCGACgcacccattcc	SEQ ID NO:73
24818	pDAB104005	tccCAAAGGGTtGTTGAGgtacttgcgg	SEQ ID NO:74
24819	pDAB104005	acCGTGATGTTAACGGGtcatcactc	SEQ ID NO:75
24796	pDAB104006	gaGAAGTAAGGGACGAGggagaaggagt	SEQ ID NO:76
24797	pDAB104006	tgGAAGTAcAGTCATCGAAGccaccatt	SEQ ID NO:77
24836	pDAB104007	gtAGAGACcGTAGCAGACggcgaggatg	SEQ ID NO:78
24837	pDAB104007	gctACGCTGCTgTCCAAGGaggtgcctc	SEQ ID NO:79
24844	pDAB104008	gaGCCAGGCAGAAGTAGGGAGgggggtg	SEQ ID NO:80
24845	pDAB104008	acTGGGCCTGCCAGGGCtgctctaac	SEQ ID NO:81
24820	pDAB104009	gaGAGGCCaGGCGAAGTAAGggaggg	SEQ ID NO:82
24821	pDAB104009	acTGGGCCTGCCAGGGCtgctctaac	SEQ ID NO:83
24828	pDAB104010	agGCCAGtAGAGAGGCCaggcgaagta	SEQ ID NO:84
24829	pDAB104010	ccAGGGCTGCGTCCATAACCGggctcg	SEQ ID NO:85
24832	pDAB104011	taGTCGCTGAAGGCGTGGTGGccgcact	SEQ ID NO:86
24833	pDAB104011	agTGGCTGGACGACCCGTCGccctcat	SEQ ID NO:87

ПРИМЕР 3: ОЦЕНКА РАСПЩЕПЛЕНИЯ НУКЛЕАЗОЙ С ЦИНКОВЫМИ ПАЛЬЦАМИ ГЕНОВ FAD2
СБОРКА КОНСТРУКЦИИ

Плазмидные векторы, содержащие экспрессирующие ZFN конструкции

илюстративных нуклеаз с цинковыми пальцами, которые были идентифицированы с использованием анализа на дрожжах, который описан в примере 2, конструировали и получали, используя приемы и методики, общезвестные в данной области. Каждую последовательность, кодирующую цинковый палец,сливали с последовательностью, 5 кодирующей сигнал ядерной локализации ораque-2 (Maddaloni et al. (1989) Nuc. Acids Res. 17(18): 7532), которую располагали выше нуклеазы с цинковыми пальцами.

Затем слитую последовательность сигнала ядерной локализации ораque-2::нуклеазы с цинковыми пальцами спаривали с комплементарной слитой последовательностью сигнала ядерной локализации ораque-2::нуклеазы с цинковыми пальцами. Как таковая, 10 каждая конструкция состояла из одной открытой рамки считывания, состоящей из двух слитых последовательностей сигнала ядерной локализации ораque-2::нуклеазы с цинковыми пальцами, разделенных последовательностью 2A из вируса *Thosea asigna* (Mattion et al. (1996), J. Virol. 70: 8124-8127). Экспрессией слитых белков управлял относительно сильный конститтивный промотор, такой как промотор, полученный 15 из промотора вируса мозаики прожилок маниока (CsVMV) и фланкированный 3'-нетраслируемой областью ORF23 *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3'UTR).

Векторы собирали, используя методику IN-FUSION™ Advantage (Clontech, Mountain View, CA). Эндонуклеазы рестрикции получали из New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA), и использовали ДНК-лигазу T4 (Invitrogen) для лигирования ДНК. Получение 20 плазмид осуществляли, используя набор для плазмид NUCLEOSPIN® (Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, PA) или набор Plasmid Midi Kit (Qiagen), следуя инструкциям поставщиков. Фрагменты ДНК выделяли, используя набор для экстракции из геля QIAquick (Qiagen) после электрофореза в агарозном геле в трис-ацетате. Колонии всех собранных плазмид сначала подвергали скринингу, используя рестрикционное расщепление минипрепаратов 25 ДНК. Плазмидная ДНК выбранных клонов была секвенирована коммерческой фирмой по секвенированию (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL). Данные о последовательностях собирали и анализировали, используя компьютерную программу SEQUENCER™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI). Перед доставкой протопластов *B. napus* готовили плазмидную ДНК из культур *E. coli*, используя систему Pure Yield Plasmid Maxiprep 30 System® (Promega Corporation, Madison, WI) или набор Plasmid MAXI KIT® (Qiagen, Valencia, CA), следуя инструкциям поставщиков.

Полученные в результате одиннадцать плазмидных конструкций, pDAB 104008 (содержащая конструкцию ZFN24845 и ZFN24844), pDAB 104009 (содержащая конструкцию ZFN24820 и ZFN24821), pDAB104010 (содержащая конструкцию ZFN24828 35 и ZFN24829) (фиг.5), pDAB 104003 (содержащая конструкцию ZFN24810 и ZFN24811), pDAB104011 (содержащая конструкцию ZFN24832 и ZFN24833), pDAB104002 (содержащая конструкцию ZFN24794 и ZFN24795), pDAB 104006 (содержащая конструкцию ZFN24796 и ZFN24797), pDAB 104004 (содержащая конструкцию ZFN24814 и ZFN24815), pDAB 104001 (содержащая конструкцию ZFN24800 и ZFN24801), pDAB 40 104005 (содержащая конструкцию ZFN24818 и ZFN24819) и pDAB 104007 (содержащая конструкцию ZFN24836 и ZFN24837) проверяли посредством расщепления ферментами рестрикции и секвенированием ДНК. В таблице 10 перечислены различные конструкции и специфические FAD последовательности, где каждый ZFN конструировали для связывания и расщепления.

45 Полученные в результате плазмидные конструкции; pDAB107824 (ZFN 28025-2A-28026), pDAB107815 (ZFN 27961-2A-27962), pDAB107816 (ZFN 27969-2A-27970), pDAB107817 (ZFN 27973-2A-27974), pDAB107825 (ZFN 28035-2A-28036), pDAB107826 (ZFN 28039-2A-28040), pDAB107818 (ZFN 27987-2A-27988), pDAB107827 (ZFN 28051-2A-

28052), pDAB107821 (ZFN 28004-2A-28005), pDAB107819 (ZFN 27989-2A-27990),
 pDAB107828 (ZFN 28053-2A-28054), pDAB107829 (ZFN 28055-2A-28056), pDAB107820
 (ZFN 27991-2A-27992), pDAB107822 (ZFN 28021-2A-28022) и pDAB107823 (ZFN 28023-
 2A-28024 проверяли посредством расщепления ферментами рестрикции и
 5 секвенированием ДНК.

Таблица 10 Указан связывающий мотив белка цинкового пальца и соответствующий номер конструкции. Каждый цинковый палец конструировали так, чтобы он связывал и расщеплял FAD2A, который описан в таблице.				
	Конструкция ZFN	№ конструкции	Идентификационный номер локуса	Сайт разрезания мишени в последовательности FAD2A
10	24844-2A-24845	pDAB104008	FAD2_ZFN_Locus1_F2A	263-265
	24820-2A-24821	pDAB104009	FAD2_ZFN_Locus1_F2B	265
	24828-2A-24829	pDAB104010	FAD2_ZFN_Locus1_F2C	275
	24810-2A-24811	pDAB104003	FAD2_ZFN_Locus2_F1D	343-345
	24832-2A-24833	pDAB104011	FAD2_ZFN_Locus2_F1E	345-346
15	24794-2A-24795	pDAB104002	FAD2_ZFN_Locus3_F2F	402
	24796-2A-24797	pDAB104006	FAD2_ZFN_Locus3_F2G	408
	24814-2A-24815	pDAB104004	FAD2_ZFN_Locus3_F2H	408-410
	24800-2A-24801	pDAB104001	FAD2_ZFN_Locus4_F1J	531
	24818-2A-24819	pDAB104005	FAD2_ZFN_Locus4_F1K	532-534
	24836-2A-24837	pDAB104007	FAD2_ZFN_Locus5_F1L	724

ПОЛУЧЕНИЕ ДНК ДЛЯ ТРАНСФЕКЦИИ

Плазмидную ДНК описанных выше векторов стерилизовали преципитацией и промывкой в 100% (об./об.) этаноле и сушили в ламинарном боксе. Осадок ДНК суспендировали в 30 мкл стерильной бидистиллированной воды в конечной концентрации 0,7 мкг/мкл для трансфекции в протопласты клеток, как описано ниже.

Осуществляли получение плазмидной ДНК, чтобы получить суперспиральную плазмидную ДНК для временной трансфекции и линеаризованную плазмидную ДНК для стабильной трансфекции. Добавление ДНК-носителя (например, ДНК спермы рыб) к трансформирующей плазмиде не требовалось в случае временной трансфекции протопластов клеток. В случае временных исследований использовали примерно 30 мкг плазмидной ДНК на трансформацию 10^6 протопластов.

ТРАНСФЕКЦИЯ

Трансфекцию *Brassica napus* L. сорта DH 10275 осуществляли как описано Spangenberg et al. (1986) (Plant Physiology 66: 1-8), препараты сред описаны в публикации Spangenberg G. and Protrykus I. (1995) Polyethylene Glycol-Mediated Direct Gene Transfer in Tobacco

35 Protoplasts. B: Gene Transfer to Plants. (Protrykus I. and Spangenberg G. Eds.) Springer-Verlag, Berlin. Семена *Brassica napus* поверхностью стерилизовали в 70% этаноле. Семена погружали в 12 мл 70% раствора этанола и перемешивали, осторожно покачивая смесь в течение 10 минут. 70% раствор этанола удаляли, сливая раствор и заменяя раствором для стерилизации семян, состоящим из 1% масс./об. гипохлорита кальция и 0,1% об./об. твина-20. Семена погружали в раствор для стерилизации семян и перемешивали, осторожно покачивая смесь в течение 25 минут. Раствор для стерилизации семян сливался, и стерильные семена промывали три раза в 50 мл стерильной воды. Наконец, семена переносили на стерильный диск из фильтровальной бумаги диаметром 80 мм

40 WHATMAN® (Fisher-Scientific, St. Louis, MO), который был вложен в чашку Петри, и семена слегка смачивали стерильной водой. Чашку Петри герметично закрывали, используя парафильм (Fisher-Scientific, St. Louis, MO), и инкубировали при 25°C в полной темноте в течение одного-двух дней. После того как наблюдали признаки появления всходов из семян, проростки переносили в чашку Петри, содержащую отверженную

среду GEM, чтобы обеспечить дальнейшее прорастание семян. Проростки инкубировали на среде GEM при 25°C в течение четырех-пяти дней.

Объем жидкой среды PS (примерно 10 мл) сливали в стерильную чашку Петри.

Используя стерильные пинцет и скальпель, наземную часть четырех-пятидневных

- 5 проростков в стадии роста и развития, соответствующей появлению 4 листьев, извлекали и удаляли. Определяли участки гипокотиля длиной 20-40 мм для получения наибольшей популяции небольших богатых цитоплазмой протопластов. Асептически вырезали кусочки гипокотиля и переносили в жидкую среду PS. Вырезанные кусочки гипокотиля группировали вместе и разрезали поперечно на кусочки длиной 5-10 мм. Затем кусочки
- 10 гипокотиля переносили в свежую среду PS и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Плазмолизированные гипокотиля переносили в чашку Петри, содержащую раствор фермента. Следили за тем, чтобы погрузить все кусочки гипокотиля в раствор. Чашки Петри герметично закрывали парафильмом и инкубировали в течение ночи от шестнадцати до восемнадцати часов при 20-22°C,
- 15 осторожно покачивая.

Протопласти клеток высвобождали из кусочков гипокотиля. Подвергнутые расщеплению в течение ночи гипокотиля осторожно встряхивали, чтобы высвободить протопласти в раствор фермента. Чашку Петри слегка наклоняли, чтобы легче перенести расщепляющую супензию, которая состояла из раствора фермента и остатков

- 20 растения. Используя пипетку объемом 10 мл, расщепляющую супензию переносили в стерилизованный блок для фильтрования протопластов (фильтр с отверстиями 100 микрон), чтобы затем отделить протопласти от растительных остатков. Осторожно постукивали по фильтрационному блоку, чтобы высвободить избыток жидкости, который улавливался на сите. Супензию протопластов, примерно от 8 до 9 мл,
- 25 осторожно перемешивали и распределяли в стерильные пластиковые круглодонные центрифужные пробирки объемом 14 мл. На каждую супензию насылали 1,5 мл раствора W5. Раствор W5 осторожно распределяли над супензией протопластов под наклоном и распределяли по каплям с минимальным встряхиванием. Добавление раствора W5 к супензии протопластов приводило к получению богатого протопластами
- 30 промежуточного слоя. Такой промежуточный слой собирали, используя пипетку. Затем собранные протопласти переносили в новую центрифужную пробирку объемом 14 мл и осторожно перемешивали. Выход и получаемые протопласти определяли, используя гемоцитометр, чтобы определить количество протопластов в миллилитре. Способ повторяли, при этом расщепляли ткань листа, чтобы получить мезофильные
- 35 протопласти.

Затем добавляли раствор W5 в объеме 10 мл, и протопласти осаждали при 70 g, затем раствор W5 удаляли. Остальную часть супензии протопластов ресуспендировали, осторожно встряхивая. Каждую пробирку, содержащую супензию протопластов, наполняли 5 мл раствора W5 и инкубировали при комнатной температуре от одного

- 40 до четырех часов. Супензии протопластов осаждали при 70 g, и весь раствор W5 удаляли. Затем добавляли по 300 мкл буфера для трансформации в каждую из супензий осажденных протопластов, которые содержали изолированные протопласти. В каждую пробирку к супензии протопластов добавляли 10 мкг плазмидной ДНК. Плазмидная ДНК состояла из конструкций нуклеаз с цинковыми пальцами, описанных выше
- 45 (например, pDAB 104010). Затем к супензии протопластов добавляли 300 мкг предварительно нагретого раствора ПЭГ 4000 и по пробиркам осторожно постукивали. Супензии протопластов и смесь для трансформации инкубировали при комнатной температуре в течение пятнадцати минут без встряхивания. В каждую пробирку

дополнительно добавляли 10 мл раствора W5, осуществляя добавления последовательно, используя аликвоты 1 мл, 1 мл, 1 мл, 2 мл, 2 мл и 3 мл, при этом осторожно переворачивая пробирки между каждыми добавлениями раствора W5. Протопласты осаждали окручивая на центрифуге при 70 g. Весь раствор W5 удаляли, оставляя чистую

5 супензию протопластов.

Затем к осажденным протопластам клеток добавляли 0,5 мл среды K3, и клетки ресуспендировали. Ресуспендированные протопласты клеток помещали в центр чашки Петри и добавляли 5 мл K3 и 0,6 мл агарозы Sea PlaqueTM (CambreX, East Rutherford, NJ) в концентрации 1:1. Чашки Петри встряхивали одним осторожным вихревым движением

10 и оставляли для инкубации на 20-30 минут при комнатной температуре. Чашки Петри герметично закрывали парафильмом, и протопласты культивировали в течение двадцати четырех часов в полной темноте. После инкубации в темноте чашки Петри

15 культивировали в течение шести дней при слабом освещении ($5 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{сек}^{-1}$, лампы белого свечения Lumilux Osram L36 W/21). После стадии культивирования использовали стерильный шпатель, чтобы разделить агарозу, содержащую протопласты, на квадранты. Разделенные квадранты помещали в пластиковый культуральный сосуд объемом 250 мл, содержащий 20 мл среды A, и инкубировали в роторном встряхивателе при 80 об/мин и амплитудой качания 1,25 см при 24°C и непрерывном тусклом освещении в течение 14 дней и затем анализировали, чтобы определить уровень активности каждой

20 конструкции нуклеазы с цинковыми пальцами.

ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК ИЗ ПРОТОПЛАСТОВ КАНОЛЫ

Трансфицированные протопласты получали в отдельных микроцентрифужных пробирках объемом 1,5 или 2,0 мл. Клетки были в осадке на дне пробирки в буферном растворе. Экстракцию ДНК осуществляли, мгновенно замораживая клетки в жидком азоте с последующим сушкой клеток вымораживанием в течение примерно 48 часов в устройстве LABCONCO FREEZONE 4.5® (Labconco, Kansas City, MO) при -40°C и давлении примерно 133×10^{-3} мбар. Лиофилизованные клетки подвергали экстракции ДНК, используя набор для растений DNEASY® (QIAGEN, Carlsbad, CA), следуя инструкция производителя, за исключением того, что разрушение ткани не требовалось, и

30 протопласты клеток добавляли непосредственно в лизирующий буфер.

ТЕСТИРОВАНИЕ ZFN FAD2A И FAD3D В ОТНОШЕНИИ РАСПЩЕПЛЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОМНОЙ ДНК В ПРОТОПЛАСТАХ КАНОЛЫ

Дизайн сайтов-мишеней ZFN в случае локуса генов FAD2A и FAD3 был таким, чтобы сгруппировать сайты-мишени таким образом, чтобы несколько пар ZFN перекрывали сайты-мишени. Группирование сайтов-мишеней ZFN давало возможность сконструировать ПЦР-праймеры, которые могли бы амплифицировать окружающую геномную последовательность всех представителей семейства генов FAD2A и FAD3 в пределах окна в 100 п. н., чтобы инкапсулировать все перекрывающиеся сайты-мишени ZFN. Соответственно, можно использовать методику коротких последовательностей-ридов Illumina, чтобы оценить целостность сайта-мишени ZFN в трансфицированных протопластиах. Кроме того, в сконструированные ПЦР-праймеры было необходимо включить специфичные нуклеотидные основания, которые позволяли бы отнести риды последовательностей к конкретному гену, представителю семейства FAD2A и FAD3.

40 Таким образом, в случае всех ПЦР-праймеров требовалось связывание 5-10 нуклеотидов в сторону от любого сайта разрезания мишени ZFN, так как известно, что активность в негомологичном связывании концов (NHEJ) вызывает небольшие делеции, которые могут удалить сайт праймирования, ингибировать амплификацию и поэтому нарушить оценку активности NHEJ.

Конструировали праймеры так, чтобы они связывались со всеми локусами-мишениями ZFN для семейств генов FAD2A и FAD3 (таблица 11), и эмпирически тестировали в отношении амплификации всех представителей семейств генов, используя основанное на способе Сэнгера секвенирование продуктов ПЦР-амплификации. В нескольких случаях можно было не разрабатывать праймеры, которые могли бы различать всех представителей генного семейства (таблица 12 и таблица 13), однако нужно, чтобы во всех случаях можно было различить генные последовательности-мишени FAD2A и FAD3. После конструирования ПЦР-праймеров индивидуальные последовательности ДНК-штрих-кода включали в ПЦР-праймеры, которые использовали для того, чтобы отличить разные локусы-мишени ZFN и идентифицировать специфичные риды последовательностей для трансфекции и ZFN (таблицы 11, 12 и 13).

Таблица 11

Последовательности праймеров, сконструированных для оценки активности ZFN FAD2 и FAD3. Праймеры содержали индивидуальные штрих-коды, наряду с необходимыми адаптерными последовательностями Illumina для конструирования библиотеки Illumina для анализа с использованием секвенирования путем синтеза

	Номер локуса	SEQ ID NO:	Последовательность праймера к адаптеру Illumina	Штрих-код	Праймер локуса
15	FAD2_ZFN_Locus1_F	88	ACACTCTTCCCTACACGACGCTTCCGA TCT	CGGG	CCCTCTCYCYTACYTCGCC
20	FAD2_ZFN_Locus1_F2A	89	ACACTCTTCCCTACACGACGCTTCCGA TCT	ACGTA	CCCTCTCYCYTACYTCGCC
25	FAD2_ZFN_Locus1_F2B	90	ACACTCTTCCCTACACGACGCTTCCGA TCT	CGTAC	CCCTCTCYCYTACYTCGCC
30	FAD2_ZFN_Locus1_F2C	91	ACACTCTTCCCTACACGACGCTTCCGA TCT	GTACG	CCCTCTCYCYTACYTCGCC
35	FAD2_ZFN_Locus2_F1D	92	ACACTCTTCCCTACACGACGCTTCCGA TCT	TACGT	GTCATAGCCCACGAGTGCGGC
40	FAD2_ZFN_Locus2_F1E	93	ACACTCTTCCCTACACGACGCTTCCGA TCT	CTGAC	GTCATAGCCCACGAGTGCGGC
45	FAD2_ZFN_Locus3_F2F	94	ACACTCTTCCCTACACGACGCTTCCGA TCT	TGACT	GTCGGCCTCATCTTCACTCC
	FAD2_ZFN_Locus3_F2G	95	ACACTCTTCCCTACACGACGCTTCCGA TCT	GAUT	GTCGGCCTCATCTTCACTCC
	FAD2_ZFN_Locus3_F2H	96	ACACTCTTCCCTACACGACGCTTCCGA TCT	ACTGA	GTCGGCCTCATCTTCACTCC
	FAD2_ZFN_Locus4_F1J	97	ACACTCTTCCCTACACGACGCTTCCGA TCT	GCTAG	CAGACATCAAGTGGTACGGC
	FAD2_ZFN_Locus4_F1K	98	ACACTCTTCCCTACACGACGCTTCCGA TCT	CTAGC	CAGACATCAAGTGGTACGGC
	FAD2_ZFN_Locus5_F1L	99	ACACTCTTCCCTACACGACGCTTCCGA TCT	TAGCT	ATCTCCGACGCTGGCATCCTC
	FAD2_ZFN_Locus1_R1A	100	CGGTCTGGCATTCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	ACGTA	CTGGTAGTCGCTGAAGGCGT
	FAD2_ZFN_Locus1_R1B	101	CGGTCTGGCATTCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	CGTAC	CTGGTAGTCGCTGAAGGCGT
	FAD2_ZFN_Locus1_R1C	102	CGGTCTGGCATTCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	GTACG	CTGGTAGTCGCTGAAGGCGT
	FAD2_ZFN_Locus2_R1D	103	CGGTCTGGCATTCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	TACGT	GGACGAGGAGGAAGGAGTGG
	FAD2_ZFN_Locus2_R1E	104	CGGTCTGGCATTCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	CTGAC	GGACGAGGAGGAAGGAGTGG
	FAD2_ZFN_Locus3_R1F	105	CGGTCTGGCATTCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	TGACT	AGTGTGGAATGGTGGCGTCG
	FAD2_ZFN_Locus3_R1G	106	CGGTCTGGCATTCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	GAUT	AGTGTGGAATGGTGGCGTCG
	FAD2_ZFN_Locus3_R1H	107	CGGTCTGGCATTCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	ACTGA	AGTGTGGAATGGTGGCGTCG
	FAD2_ZFN_Locus4_R1J	108	CGGTCTGGCATTCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	GCTAG	CCCCGAGACGTTGAAGGCTAAG
	FAD2_ZFN_Locus4_R1K	109	CGGTCTGGCATTCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	CTAGC	CCCCGAGACGTTGAAGGCTAAG

	FAD2_ZFN_Locus5_R1L	110	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	TAGCT	GAAGGATGCGTGTGCTGCAAG
5	FAD3_ZFN_Locus1A_F3	111	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	ACGTA	CCTTTCTTCACCACATTYCA
	FAD3_ZFN_Locus1B_F3	112	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	CGTAC	CCTTTCTTCACCACATTYCA
	FAD3_ZFN_Locus2C_F1	113	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	CTGAC	GATGGTTGTCGCTATGGACC
	FAD3_ZFN_Locus3D_F1	114	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	TGACT	CGAAAGGTTTGATCCRAGCG
10	FAD3_ZFN_Locus3E_F1	115	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	GAUTG	CGAAAGGTTTGATCCRAGCG
	FAD3_ZFN_Locus3F_F1	116	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	ACTGA	CGAAAGGTTTGATCCRAGCG
	FAD3_ZFN_Locus4G_F1	117	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	GCTAG	CCGTGTATTTGATACTGGITC
	FAD3_ZFN_Locus4H_F1	118	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	CTAGC	CCGTGTATTTGATACTGGITC
15	FAD3_ZFN_Locus5J_F1	119	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	TAGCT	GGAGCTCTCAGACATTCCCT
	FAD3_ZFN_Locus6K_F1	120	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	TCAGT	GTTTATTGCCCAAGCGAGAG
	FAD3_ZFN_Locus6L_F1	121	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	CAGTC	GTTTATTGCCCAAGCGAGAG
	FAD3_ZFN_Locus6M_F1	122	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	AGTCA	GTTTATTGCCCAAGCGAGAG
20	FAD3_ZFN_Locus6N_F1	123	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	GTCAG	GTTTATTGCCCAAGCGAGAG
	FAD3_ZFN_Locus7P_F3	124	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	GTACG	ACTTCAACTACTTGCTGGCSAT
	FAD3_ZFN_Locus7Q_F3	125	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGA TCT	TACGT	ACTTCAACTACTTGCTGGCSAT
25	FAD3_ZFN_Locus1A_R1	126	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	ACGTA	CGTTCACATTGSTRCGYTGG
	FAD3_ZFN_Locus1B_R1	127	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	CGTAC	CGTTCACATTGSTRCGYTGG
	FAD3_ZFN_Locus2C_R1	128	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	CTGAC	CCGATCTAACGGYGGTTGT
	FAD3_ZFN_Locus3D_R1	129	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	TGACT	TAGTCATGGATCTCAAAGGACT
30	FAD3_ZFN_Locus3E_R1	130	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	GAUTG	TAGTCATGGATCTCAAAGGACT
	FAD3_ZFN_Locus3F_R1	131	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	ACTGA	TAGTCATGGATCTCAAAGGACT
	FAD3_ZFN_Locus4G_R_uni	132	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	GCTAG	TTAAATTACCACTCGTGGCC
	FAD3_ZFN_Locus4H_R_uni	133	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	CTAGC	TTAAATTACCACTCGTGGCC
35	FAD3_ZFN_Locus5J_R2	134	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	TAGCT	CTTTTTCTCGATKCTAAAGATT
	FAD3_ZFN_Locus6K_R1	135	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	TCAGT	CTGTGACTGGACCAACGAGG
	FAD3_ZFN_Locus6L_R1	136	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	CAGTC	CTGTGACTGGACCAACGAGG
40	FAD3_ZFN_Locus6M_R1	137	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	AGTCA	CTGTGACTGGACCAACGAGG
	FAD3_ZFN_Locus6N_R1	138	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	GTCAG	CTGTGACTGGACCAACGAGG
	FAD3_ZFN_Locus7P_R1	139	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	GTACG	ACTTACAATGTAAGGAACRCCRTA
45	FAD3_ZFN_Locus7Q_R1	140	CGGTCTCGCATTCCCTGCTGAACCGCTCT TCCGATCT	TACGT	ACTTACAATGTAAGGAACRCCRTA

Таблица 12

Эффективность сконструированных ПЦР-праймеров в амплификации семейств генов FAD2. «X» означает специфичность выявления генных копий, закрашивание серым и «+» указывают, что в конкретном исследуемом локусе ряды последовательностей, полученные с использованием двух праймеров, невозможно было отличить, и «N/A» означает, что локус невозможно было амплифицировать с таких специфичных генных копий

Локус ZFN	Копия гена FAD			
	FAD2A	FAD2C	FAD2A'	FAD2C'
Локус 1	X	X	X	X
Локус 2	X	X	X	X
Локус 3	+	+	X	X
Локус 4	X	X	X	X
Локус 5	X	X	X	X

Таблица 13

Эффективность сконструированных ПЦР-праймеров в амплификации семейств генов FAD3. «X» означает специфичность выявления генных копий, закрашивание серым и «+» указывают, что в конкретном исследуемом локусе ряды последовательностей, полученные с использованием двух праймеров, невозможно было отличить, и «N/A» означает, что локус невозможно было амплифицировать с таких специфичных генных копий

Локус ZFN	Копия гена FAD					
	FAD3A	FAD3C	FAD3A'	FAD3C'	FAD3A''	FAD3C''
Локус 1	X	X	X	X	X	X
Локус 2	X	X	X	X	N/A	X
Локус 3	X	X	+	+	X	X
Локус 4	X	X	X	X	+	+
Локус 5	X	X	N/A	N/A	N/A	N/A
Локус 6	X	X	X	X	X	X
Локус 7	X	X	X	X	X	X

После экстракции ДНК протопластов канолы, трансфицированных ZFN, осуществляли ПЦР-амплификацию локусов-мишеней ZFN, чтобы создать необходимые специфичные для локусов молекулы ДНК в правильной форме для основанного на Illumina секвенирования с использованием методики синтеза. Каждый анализ оптимизировали так, чтобы он работал при использовании 25 нг исходной ДНК (примерно 12500 клеточных эквивалентов генома Brassica napus). Проводили несколько реакций на образец, чтобы обеспечить охват, необходимый для оценки эффективности и специфичности NHEJ на соответствующем уровне, примерно шестнадцать ПЦР-реакций, эквивалентных 200000 копиям генома Brassica napus из отдельных протопластов.

Исходные смеси (мастер-микс) для ПЦР-амплификации готовили для всех образцов, которые тестировали в одном и том же анализе, и одну реакцию, осуществляющую в трех повторах, анализировали, используя способ количественной ПЦР, который применяли для определения оптимального количества циклов, осуществляемых на ткани-мишени, чтобы гарантировать, что ПЦР-амплификация не стала ограниченной по реагентам и все еще была в стадии экспоненциальной амплификации. Эксперименты с необходимыми негативными контрольными реакциями осуществляли в 96-луночном формате, используя MX3000P THE MOCYCLER® (Stratagene, LaJolla, CA). На основании данных, полученных на платформе количественной ПЦР, относительное увеличение флуоресценции наносили на график по циклам и определяли количество циклов на анализ, которое может обеспечивать достаточную амплификацию, при этом не позволяя реакции становиться ограниченной по реагентам и пытаясь снизить осуществление излишних циклов и амплификацию общих транскриптов или молекул. Неиспользованную исходную смесь оставляли на льду до тех пор, пока не был закончен анализ с использованием количественной ПЦР, и не было определено количество циклов, и затем делили на аликвоты в необходимое количество реакционных пробирок (примерно 16 на анализ ZFN) и осуществляли ПЦР-реакцию. После амплификации образцы для одного локуса ZFN объединяли вместе и 200 мкл объединенного продукта на одну ZFN очищали, используя набор для очистки ПЦР-продуктов MINELUTE® (Qiagen), следуя инструкциям производителя. Чтобы обеспечить секвенирование образца с использованием методики коротких ридов Illumina требовалось связать с создаваемыми фрагментами при амплификации дополнительные праймеры спаренных концов. Этого достигали путем ПЦР-амплификации с использованием праймеров, которые могут быть частично комплементарными последовательности, добавляемой в первом раунде амплификации, но также содержат необходимую парную концевую последовательность. Снова определяли оптимальное количество осуществляемых циклов ПЦР, которые могут добавлять парные концевые последовательности без сверхамплификации общих фрагментов, пропуская образец в анализе циклов количественной ПЦР, как описано ранее. После ПЦР-амплификации созданный продукт очищали, используя колонку MINELUTE® (Qiagen), следуя инструкциям производителя, и разделяли в 2,5% агарозном геле. Фрагменты ДНК, визуализированные с использованием SYBER SAFE® (Life Technologies, Carlsbad, CA) в виде полос правильного размера, экстрагировали из геля, чтобы удалить остаточные созданные в ПЦР димеры праймеров или другие ложные фрагменты, при этом ДНК экстрагировали из кусочка геля, используя набор для экстракции MINELUTE® (Qiagen), следуя инструкциям производителя. После завершения экстракции из геля проводили дополнительную очистку ДНК, используя магнитные шарики AMPURE® (Beckman-Coulter, Brea, CA) при соотношении ДНК к шарикам 1:1,7. Затем оценивали концентрацию ДНК, используя набор для количественного анализа библиотек на основе количественной ПЦР для секвенирования Illumina (KAPA) в разведении 1/40000 и 1/80000, при этом реакцию осуществляли в трех повторах. На основании результатов количественной ПЦР ДНК разбавляли до стандартной концентрации 2 нМ и объединяли со всеми библиотеками для секвенирования ДНК. Образцы готовили для секвенирования, используя набор cBOT CLUSTER® (Illumina, San Diego, CA), и секвенировали на ILLUMINA GA2X®, используя риды для секвенирования спаренных концов длиной 100 п. н., следуя инструкциям производителя.

СПОСОБ АНАЛИЗА ДАННЫХ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НЕГОМОЛОГИЧНОГО КОНЦЕВОГО СВЯЗЫВАНИЯ В САЙТАХ-МИШЕНЯХ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ

После завершения реакции секвенирования и определения первичных данных,

осуществляемого с использованием биоинформационного конвейера Illumina для распознавания оснований, осуществляли полный анализ, чтобы идентифицировать делетированные в сайте-мишени ZFN в каждом случае. Был создан собственный PERL-скрипт для того, чтобы с помощью вычислительных средств извлечь и отсортировать

5 штрих-коды последовательностей ДНК, прослеживая список вводимых последовательностей. Штрих-код должен соответствовать эталонной последовательности с приемлемой оценкой Phred более 30, чтобы уменьшить их ошибочное приписывание ридам последовательностей. После того как риды последовательностей были отнесены в разные группы штрих-кодов, которые были

10 использованы, все последовательности пропускали через фильтр качества. Фильтр качества был вторым специально разработанным PERL-скриптом. Риды последовательностей исключали, если было более трех оснований, обозначенных «N», или если медианная оценка Phred была меньше 20, или если было 3 следующих друг за другом основания с оценкой Phred менее 20, или если рид последовательности имел

15 длину короче 40 п. н. Остальные последовательности объединяли, когда были доступны оба рида парных последовательностей, используя пакет NEXTGENE® (SoftGenetics, State College, PA). Оставшиеся риды объединенных последовательностей затем уменьшали до набора уникальных ридов последовательностей, используя третий специальный PERL-скрипт с использованием подсчета количества идентифицированных

20 дублированных последовательностей, зарегистрированных на конце оставшегося идентификатора последовательностей. Уникальные риды последовательностей затем выравнивали с эталонной последовательностью FAD2 и FAD3, используя компьютерную программу NEXTGENE®, которая создавала файл выравнивания FASTA с пробелами.

Используя файл FASTA с пробелами, преобразование номера положения основания

25 в пробеле в вводимый эталон осуществляли, используя четвертый специальный PERL-скрипт. Это позволяло идентифицировать в собранных данных такие основания, которые позволяют отличать разных представителей семейства генов (вариации либо гомеологичных, либо паралогичных последовательностей среди разных представителей семейств генов). После осуществления преобразования нумерации оснований можно

30 было создавать отчеты о гаплотипах для ридов каждой уникальной последовательности и относить риды к конкретным представителям семейства генов. После группировки ридов в ген идентифицировали и оценивали окно длиной 10 п. н. в окружении сайта-мишени ZFN. Регистрировали количество последовательностей с делециями на ген, а также количество пропущенных оснований.

35 Затем данные представляли графически в виде многолинейного графика, показывающего количество последовательностей с делециями 1-10 оснований в сайте-мишени ZFN на 10000 ридов последовательностей (фиг.6). Такой анализ осуществляли в случае всех трансфекций ZFN и контрольных трансфекций. В нескольких случаях повторы в нативной последовательности ДНК приводили к увеличению ошибки

40 секвенирования в сайте-мишени ZFN, такую ошибку обычно можно рассматривать как увеличение распространенности делеций отдельных оснований, о которых сообщалось в случае всех образцов, как трансфицированных ZFN, так и контрольных (фиг.7).

На основании полученных результатов наиболее высокий уровень активности ZFN в сайте-мишени FAD2, который определяли по наиболее высокой активности NHEJ,

45 идентифицировали в локусе E. ZFN, которые были закодированы в плазмиде pDAB104010 (т.е., ZFN24828 и 24829) были выбраны для таргетинга *in planta* сконструированной платформы для интеграции трансгена (ETIP), учитывая их характеристики значимой активности в расщеплении геномной ДНК и минимальной активности, не связанной с

мишенью.

ПРИМЕР 4: КОНСТРУКЦИИ ДНК ЛИНИЙ РАСТЕНИЙ КАНОЛЫ С СКОНСТРУИРОВАННОЙ ПЛАТФОРМОЙ ИНТЕГРАЦИИ ТРАНСГЕНОВ (ETIP)

Конструкции плазмидных векторов, описанные ниже, были построены с применением

5 способов и методик, известных специалисту в данной области. Применение конкретных реагентов и методик, описанных в настоящем абзаце, хорошо известно специалистам в данной области, и они легко взаимозаменямы другими реагентами и методиками для достижения требуемой цели создания конструкций плазмидных векторов.

Эндонуклеазы рестрикции получали из New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA).

10 Лигирование осуществляли, используя ДНК-лигазу T4 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Реакцию Gateway осуществляли, используя смесь ферментов GATEWAY® LR CLONASE® (Invitrogen) для встраивания путем сборки одного исходного вектора в один целевой вектор. Реакции INFUSION™ осуществляли, используя методику IN-FUSION™ Advantage Technology (Clontech, Mountain View, CA) для встраивания путем сборки одного исходного

15 вектора в один целевой вектор. Получение плазмид осуществляли, используя набор для плазмид NUCLEOSPIN® (Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, PA) или набор для плазмид Midi Kit® (Qiagen), следуя инструкциям поставщиков. Фрагменты ДНК выделяли, используя набор для экстракции из геля QIAquick (Qiagen) после гель-электрофореза в агарозе-трис-ацетате. Колонии всех собранных плазмид сначала подвергали скринингу,

20 используя рестрикционное расщепление минипрепаратов ДНК. Плазмидная ДНК выбранных клонов была секвенирована коммерческой фирмой по секвенированию (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL). Данные о последовательностях собирали и анализировали, используя компьютерную программу SEQUENCER™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI).

25 ВЕКТОРЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ПРЯМУЮ ДОСТАВКУ, ДЛЯ ТОЧНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ETIP В ЛОКУС FAD2A КАНОЛЫ

Использовали стандартные способы клонирования для конструирования ETIP-содержащих векторов pDAS000130 (фиг.8, вставка Т-нити в виде последовательности SEQ ID NO: 141) для специфичной интеграции в ген FAD2A *B. napus*. Такая конструкция 30 была создана для доставки в протопласты канолы с конструкцией нуклеазы с цинковыми пальцами pDAB1004010. Конструкция нуклеазы с цинковыми пальцами будет расщеплять локус FAD2A, и затем конструкция pDAS000130 будет интегрирована в геном канолы посредством механизма зависимой от гомологии reparации. ETIP состоит из четырех кассет экспрессии (две неполных), разделенных дополнительными последовательностями

35 распознавания ZFN, и сконструированной посадочной площадки (ELP), содержащей другие последовательности распознавания ZFN. Дополнительные последовательности распознавания ZFN являются уникальными и были сконструированы для целенаправленного введения полинуклеотидных последовательностей в трансгенные инсерции ETIP и ELP. Подобным образом последовательности распознавания ZFN

40 могут быть использованы для вырезания полинуклеотидных последовательностей. Первая кассета экспрессии генов представляла собой неполную кассету экспрессии dsRED и содержала промотор, 5'-нетранслируемую область и инtron из гена полиубиквитина 10 *Arabidopsis thaliana* (промотор AtUbi) (Callis et al., (1990) J. Biol. Chem., 265: 12486-12493), за которыми следовали 210 п. н. гена dsRed из рифового коралла

45 *Discosoma sp.* (Clontech, Mountain View, CA), оптимизированных по кодонам для экспрессии в двудольных растениях (экзон 1 dsRED (оптимизированный для двудольных)), с последующим инtronом из гена подобного тиоредуктазе белка *Arabidopsis thaliana* (инtron 1 из тиоредуктазы At: номер доступа: NC_00374) и 3'-

нетранслируемой областью, содержащей терминатор транскрипции и сайт полиденилирования гена Vviviparous-1 (Vp1) Zea mays (терминатор Zm1lp: Paek et al., (1998) Molecules and Cells, 8(3): 336-342). Вторая кассета экспрессии содержала промотор 19S, включая 5'-UTR из вируса мозаики цветной капусты (CaMV 19S: Cook and Penon (1990) Plant Molecular Biology 14(3): 391-405), за которым следовал ген hph из *E. coli*, оптимизированный по кодонам для экспрессии в двудольных (hph(HygR): Kaster et al., (1983) Nucleic Acids Research 11 (19): 6895-6911), и 3'-UTR, содержащая терминатор транскрипции и сайт полиденилирования открытой рамки считывания 1 *A. tumefaciens* pTi15955 (терминатор At-ORF1: Barker et al., (1983) Plant Molecular Biology 2(6): 335-50).

Третья кассета экспрессии представляла собой неполную кассету экспрессии РАТ и содержала первый инtron из гена 4-кумарил-СоА-синтазы *Arabidopsis* (инtron №2 4-кумарил-СоА-синтазы v: № доступа: At3g21320/NC003074), затем следуют последние 256 п. н. синтетического оптимизированного для растений варианта гена фосфинотрицинацетилтрансферазы, выделенного из *Streptomyces viridochromogenes*, который кодирует белок, который придает резистентность к ингибиторам глутаминсинтетазы, включая фосфинотрицин, глюфосинат и биалафос (3'-конец РАТ (v6): Wohlleben et al., (1988) Gene 70(1): 25-37). Такая кассета заканчивалась областью 3'-UTR, содержащей терминатор транскрипции и сайты полиденилирования открытой рамки считывания 23 *A. tumefaciens* pTi15955 (терминатор AtuORF23: Barker et al., (1983) Plant Molecular Biology 2(6): 335-50). Четвертая кассета экспрессии представляла собой кассету гена ipt и содержала укороченный вариант длиной 588 п. н. промотора и 5'-UTR из гена ДНК-связывающего белка MYB32 *Arabidopsis* (U26933) (промотор AtMYB32 (T): Li et al., (1999) Plant Physiology 121: 313), за которым следовал ген изопентилтрансферазы (ipt) из *A. tumefaciens* и терминатор 35s, содержащий терминатор транскрипции и сайты полиденилирования из вируса мозаики цветной капусты (терминатор CaMV 35S: Chenault et al., (1993) Plant Physiology 101 (4): 1395-1396). Для доставки к FAD2A каждый конец последовательности ETIP был flankирован 1 т.п.н. геномной последовательности FAD2A с каждой стороны от положения двунитевого разрыва, индуцируемого доставкой ZFN, кодируемой в pDAB104010, к гену FAD2A *B. napus*.

Последовательность ETIP была синтезирована коммерческой фирмой, занимающейся синтезом генов (GeneArt, Life Technologies). Фрагменты длиной 1 т.п.н. геномной последовательности FAD2A амплифицировали с геномной ДНК, очищенной из ткани листа *B. napus* DH 12075 с использованием мининабора для растений Qiagen DNEASY® (Qiagen, Hilden), следуя инструкциям, предлагаемым производителем.

Последовательности FAD2A длиной 1 т.п.н. лигировали в вектор ETIP, используя лигазу T4 (NEB, Ipswich, MA). Колонии всех собранных плазмид сначала подвергали скринингу, используя рестрикционное расщепление минипрепаратов ДНК. Эндонуклеазы рестрикции получали из New England BioLabs (NEB, Ipswich, MA) и Promega (Promega Corporation, WI). Приготовление плазмид осуществляли, используя набор QIAPREP SPIN MINIPREP® (Qiagen) или систему Pure Yield Plasmid MAXIPREP® (Promega Corporation, WI), следуя инструкциям поставщиков. Плазмидную ДНК выбранных клонов секвенировали, используя секвенирование по Сэнгеру ABI и протокол цикла секвенирования BIG DYE TERMINATOR® v3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies).

Данные о последовательностях собирали и анализировали, используя компьютерную программу SEQUENCHER™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI).

ВЕКТОРЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ПРЯМУЮ ДОСТАВКУ, ДЛЯ ТОЧНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ETIP В ЛОКУС FAD3 КАНОЛЫ

Использовали стандартные способы клонирования для конструирования ETIP-содержащих векторов pDAS000271 (фиг.9, вставка Т-нити в виде последовательности SEQ ID NO: 142), pDAS000272 (фиг.10, вставка Т-нити в виде последовательности SEQ ID NO: 143), pDAS000273 (фиг.11, вставка Т-нити в виде последовательности SEQ ID NO: 144), pDAS000274 (фиг.12, вставка Т-нити в виде последовательности SEQ ID NO: 145) и pDAS000275 (фиг.13, вставка Т-нити в виде последовательности SEQ ID NO: 146) для специфичной интеграции в ген FAD3A и FAD3C *B. napus*. Такая конструкция была создана для доставки в протопласты канолы с конструкцией нуклеазы с цинковыми пальцами pDAB107828 или pDAB107829. Специфичная конструкция нуклеазы с цинковыми пальцами будет расщеплять локус FAD3A, и затем конструкция pDAS000273 или pDAS275 будет интегрирована в геном канолы посредством механизма зависимой от гомологии репарации. Подобным образом, специфичная конструкция нуклеазы с цинковыми пальцами будет расщеплять локус FAD3C, и затем конструкция pDAS000271, pDAS000272 или pDAS000274 будет интегрирована в геном канолы посредством механизма зависимой от гомологии репарации. ETIP состоит из четырех кассет экспрессии (две неполных), разделенных дополнительными последовательностями распознавания ZFN, и сконструированной посадочной площадки (ELP), содержащей другие последовательности распознавания ZFN. Дополнительные последовательности распознавания ZFN являются уникальными и были сконструированы для целенаправленного введения полинуклеотидных последовательностей в трансгенные инсерции ETIP и ELP. Подобным образом последовательности распознавания ZFN могут быть использованы для вырезания полинуклеотидных последовательностей. Первая кассета экспрессии генов представляла собой неполную кассету экспрессии dsRED и содержала промотор, 5'-нетранслируемую область и инtron из гена полиубиквитина 10 *Arabidopsis thaliana* (промотор AtUbi) (Callis et al., (1990) J. Biol. Chem., 265: 12486-12493), за которыми следовали 210 п. н. гена dsRed из рифового коралла *Discosoma sp.* (Clontech, Mountain View, CA), оптимизированных по кодонам для экспрессии в двудольных растениях (экзон 1 dsRED (оптимизированный для двудольных)), с последующим инtronом из гена подобного тиоредуктазе белка *Arabidopsis thaliana* (инtron 1 из тиоредуктазы At: номер доступа: NC_00374) и 3'-нетранслируемой областью, содержащей терминатор транскрипции и сайт полиденилирования гена Viviparous-1 (Vp1) *Zea mays* (терминатор Zmlip: Paek et al., (1998) Molecules and Cells, 8(3): 336-342). Вторая кассета экспрессии содержала промотор 19S, включая 5'-UTR из вируса мозаики цветной капусты (*CaMV* 19S: Cook and Penon (1990) Plant Molecular Biology 14(3): 391-405), за которым следовал ген hph из *E. coli*, оптимизированный по кодонам для экспрессии в двудольных (hph(HygR): Kaster et al., (1983) Nucleic Acids Research 11 (19): 6895-6911), и 3'-UTR, содержащая терминатор транскрипции и сайт полиденилирования открытой рамки считывания 1 *A. tumefaciens* pTi15955 (терминатор At-ORF1: Barker et al., (1983) Plant Molecular Biology 2(6): 335-50). Третья кассета экспрессии представляла собой неполную кассету экспрессии PAT и содержала первый инtron из гена 4-кумарил-СоА-синтазы *Arabidopsis* (инtron №2 4-кумарил-СоА-синтазы v: № доступа: At3g21320/NC003074), затем следовали последние 256 п. н. синтетического оптимизированного для растений варианта гена фосфинотрицинацетилтрансферазы, выделенного из *Streptomyces viridochromogenes*, который кодирует белок, который придает резистентность к ингибиторам глутаминсинтетазы, включая фосфинотрицин, глюфосинат и биалафос (3'-конец PAT (v6): Wohlleben et al., (1988) Gene 70(1): 25-37). Такая кассета заканчивалась областью 3'-UTR, содержащей терминатор транскрипции и сайты полиденилирования открытой

рамки считывания 23 *A. tumefaciens* pTi15955 (терминатор AtuORF23: Barker et al., (1983) Plant Molecular Biology 2(6): 335-50). Четвертая кассета экспрессии представляла собой кассету гена *ipt* и содержала укороченный вариант длиной 588 п. н. промотора и 5'-UTR из гена ДНК-связывающего белка MYB32 *Arabidopsis* (U26933) (промотор AtMYB32

- 5 (T): Li et al., (1999) Plant Physiology 121: 313), за которым следовал ген изопентилтрансферазы (*ipt*) из *A. tumefaciens* и терминатор 35s, содержащий терминатор транскрипции и сайты полиаденилирования из вируса мозаики цветной капусты (терминатор CaMV 35S: Chenault et al., (1993) Plant Physiology 101 (4): 1395-1396). Для доставки к FAD3A и FAD3C каждый конец последовательности ETIP был фланкирован
10 1 т.п.н. геномной последовательности FAD3A или FAD3C с каждой стороны от положения двунитевого разрыва, индуцируемого доставкой кодируемой ZFN к гену FAD3A или FAD3C *B. napus*.

Последовательность ETIP была синтезирована коммерческой фирмой, занимающейся синтезом генов (GeneArt, Life Technologies). Фрагменты длиной 1 т.п.н. геномной последовательности FAD3A и FAD3C амплифицировали с геномной ДНК, очищенной из ткани листа *B. napus* DH 12075 с использованием мининабора для растений Qiagen DNEASY® (Qiagen, Hilden), следуя инструкциям, предлагаемым производителем. Последовательности FAD3A или FAD3C длиной 1 т.п.н. лигировали в вектор ETIP, используя лигазу T4 (NEB, Ipswich, MA). Колонии всех собранных плазмид сначала подвергали скринингу, используя рестрикционное расщепление минипрепараторов ДНК. Эндонуклеазы рестрикции получали из New England BioLabs (NEB, Ipswich, MA) и Promega (Promega Corporation, WI). Приготовление плазмид осуществляли, используя набор QIAPREP SPIN MINIPREP® (Qiagen) или систему Pure Yield Plasmid MAXIPREP® (Promega Corporation, WI), следуя инструкциям поставщиков. Плазмидную ДНК выбранных 20 клонов секвенировали, используя секвенирование по Сэнгеру ABI и протокол цикла секвенирования BIG DYE TERMINATOR® v3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies). Данные о последовательностях собирали и анализировали, используя компьютерную программу SEQUENCER™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВЕКТОРЫ

Контрольный вектор использовали для разработки способа сортировки клеток на основе активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS). Стандартные способы клонирования использовали для конструирования контрольного вектора, pDAS000031 (фиг.14: вставка Т-нити в виде последовательности SEQ ID NO: 147), состоящего из двух кассет экспрессии генов. Первая кассета экспрессии генов содержала промотор 19s вируса мозаики цветной капусты (промотор 19S CaMV; Shillito et al., (1985) Bio/Technology 3; 1099-1103):: ген резистентности к гигромицину (hph(HygR); патент США № 4727028):: и 3'-нетранслируемую область открытой рамки считывания 1 *Agrobacterium tumefaciens* (терминатор AtORF1; Huang et al., (1990) J. Bacteriol. 1990 772: 1814-1822). Вторая кассета экспрессии генов содержала промотор убиквитина 10 *Arabidopsis thaliana* (промотор 40 AtUbi10; Callis et al., (1990) J. Biol. Chem., 265: 12486-12493):: dsRED (dsRED(D); патент США № 6852849) и инtron из *Arabidopsis* (инtron № 1; GenBank: AB025639.1):: 3-нетранслируемую область открытой рамки считывания 23 *Agrobacterium tumefaciens* (терминатор AtORF23; патент США № 5428147) в виде слияния в рамке в транс-ориентации (например, в ориентации «голова к голове»). Плазмидный вектор собирали, 45 используя методику IN-FUSION™ Advantage Technology (Clontech, Mountain View, CA).

КОНСТРУИРОВАНИЕ БИНАРНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ СЛУЧАЙНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ETIP В РАСТЕНИЯХ КАНОЛЫ

Конструировали два бинарных вектора для случайной интеграции

последовательности Т-нити ETIP в геном *Brassica napus*. Использовали стандартные способы клонирования для конструирования ETIP-содержащих векторов pDAS000036 (фиг.15, вставка Т-нити в виде последовательности SEQ ID NO: 148) и pDAS000037 (фиг.16, вставка Т-нити в виде последовательности SEQ ID NO: 149). ETIP-векторы

- 5 состоят из четырех кассет экспрессии (двух неполных кассет экспрессии), разделенных последовательностями распознавания ZFN, и сконструированной посадочной площадки (ELP), содержащей другие последовательности распознавания ZFN. Первая кассета экспрессии генов представляла собой неполную кассету экспрессии dsRED и содержала промотор, 5'-нетранслируемую область и инtron из гена полиубиквитина 10 *Arabidopsis thaliana* (промотор AtUbi) (Norris et al., (1993) Plant Molecular Biology, 21(5): 895-906), за которыми следовали 210 п. н. гена dsRed из рифового коралла *Discosoma sp.* (Clontech, Mountain View, CA), оптимизированных по кодонам для экспрессии в двудольных растениях, с последующим инtronом из гена подобного тиоредуктазе белка *Arabidopsis thaliana* (№ доступа: NC_00374) и 3'-нетранслируемой областью, содержащей терминатор
- 10 транскрипции и сайт полиаденилирования гена Viviparous-1 (Vp1) *Zea mays* (терминатор Zm Lip: Paek et al., (1998) Molecules and Cells, 8(3): 336-342). Вторая кассета экспрессии содержала промотор 19S, включая 5'-UTR из вируса мозаики цветной капусты (промотор 19 CsVMV 19S: Cook and Penon (1990) Plant Molecular Biology 14(3): 391-405), за которым следовал ген hph из *E. coli*, оптимизированный по кодонам для экспрессии в двудольных
- 15 (hph(D): Kaster et al., (1983) Nucleic Acids Research 11 (19): 6895-6911), и 3'-UTR, содержащая терминатор транскрипции и сайт полиаденилирования открытой рамки считывания 1 (PRF1) *A. tumefaciens* pTi15955 (терминатор At-ORF1: Barker et al., (1983) Plant Molecular Biology 2(6): 335-50). Третья кассета экспрессии представляла собой неполную кассету экспрессии PAT и содержала первый инtron из гена 4-кумарил-СоА-синтазы *Arabidopsis*
- 20 (№ доступа: At3g21320(NC003074)), затем следуют последние 256 п. н. синтетического оптимизированного для растений варианта гена фосфинотрицинацетилтрансферазы (PAT), выделенного из *Streptomyces viridochromogenes*, который кодирует белок, который придает резистентность к ингибиторам глутаминсинтетазы, включая фосфинотрицин, глюфосинат и биалафос (PATv6 (экзон2); Wohlleben et al., (1988) Gene 70(1): 25-37). Такая
- 25 кассета заканчивалась областью 3'-UTR, содержащей терминатор транскрипции и сайты полиаденилирования открытой рамки считывания 23 (ORF23) *A. tumefaciens* pTi15955 (терминатор AtuORF23: Barker et al., (1983) Plant Molecular Biology 2(6): 335-50). Четвертая кассета экспрессии представляла собой кассету гена ipt и содержала укороченный
- 30 вариант длиной 588 п. н. промотора и 5'-UTR из гена ДНК-связывающего белка MYB32 *Arabidopsis* (U26933) (промотор AtMYB32(T); Li et al., (1999) Plant Physiology 121: 313), за которым следовал ген изопентилтрансферазы (ipt) из *A. tumefaciens* и терминатор 35s, содержащий терминатор транскрипции и сайты полиаденилирования из вируса мозаики цветной капусты (терминатор CaMV 35S: Chenault et al., (1993) Plant Physiology 101 (4): 1395-1396).

- 40 Кассеты экспрессии и ELP были синтезированы с сайтами Multi-Gateway коммерческой фирмой, осуществляющей синтез генов (GeneArt, Life Technologies). Были сконструированы исходные клоны каждой кассеты экспрессии и ELP с использованием смеси ферментов BP Clonase II (Invitrogen, Life Technologies) и набора с вектором pDONR221 (Invitrogen, Life Technologies). Затем исходные клоны использовали в реакции Multi-Gateway со способным к Gateway бинарным вектором, используя смесь ферментов LR Clonase II Plus (Invitrogen, Life Technologies). Колонии всех собранных плазмид сначала подвергали скринингу, используя рестрикционное расщепление минипрепаратов ДНК. Эндонуклеазы рестрикции получали из New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA) и Promega
- 45

(Promega Corporation, WI). Получение плазмид осуществляли, используя набор QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden) или систему Pure Yield Plasmid MAXIPREP® (Promega Corporation, WI), следуя инструкциям поставщиков. Плазмидную ДНК выбранных клонов секвенировали, используя протокол секвенирования по Сэнгеру ABI и протокол цикла секвенирования BIG DYE TERMINATOR® v3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies). Данные о последовательностях собирали и анализировали, используя компьютерную программу SEQUENCHER™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI).

ПРИМЕР 5: СОЗДАНИЕ ЕТИР-ЛИНИЙ РАСТЕНИЙ КАНОЛЫ

ТРАНСФОРМАЦИЯ *Brassica napus*

Конструкции ETIP (pDAS000036, pDAS000037), контрольная конструкция DS-Red (pDAS000031) и специфичные для сайтов FAD2A, FAD3A и FAD3C конструкции (pDAS000130 и pDAS000271-pDAS000275) и сопутствующие нуклеазы с цинковыми пальцами (pDAB104010, pDAB10728 и pDAB10729) описаны в примере 4. Бинарными векторами трансформировали *Agrobacterium tumefaciens* штамма GV3101: PM90.

Трансформацию протопластов клеток *Brassica napus* осуществляли, используя протокол трансфекции, описанный в примере 3, с некоторыми модификациями.

Модификации протокола включали использование альгината натрия вместо агарозы Sea Plaque™. Эксперименты по трансфекции, в которых конструкцию нуклеазы с цинковыми пальцами и конструкцию ETIP доставляли совместно в протопласти клеток *Brassica napus*, осуществляли при концентрациях ДНК, соответствующей плазмидной ДНК в молярном соотношении 5:1. Другими конструкциями ETIP и контрольных плазмид трансформировали в концентрациях 30 мкг плазмидной ДНК. Соответственно, pDAS000130 использовали в концентрации 27,8 мкг плазмидной ДНК, и pDAB104010 использовали в концентрации 2,2 мкг плазмидной ДНК. Другими конструкциями ETIP и контрольных плазмид трансформировали в концентрациях 30 мкг плазмидной ДНК.

Дополнительные модификации протокола включали выращивание целых растений из трансформированных протопластов клеток в среде, содержащей 1,5 мг/мл гигромицина. При выращивании целых растений требовалась замена среды A каждые две недели, и наблюдение за ростом полученных из протопластов колоний. После того, как полученные из протопластов колонии вырастали примерно до 2-3 мм в диаметре, колонии переносили в отдельные лунки 12-луночного планшета COSTAR® (Fisher Scientific, St. Louis, MO), содержащего отверженную среду MS morpho. Планшеты инкубировали в течение одной-двух недель при 24°C при непрерывном тусклом освещении вплоть до того, как каллусы пролиферировали до размера 8-10 мм в диаметре.

После того как протопласти клеток достигали 1-2 см в диаметре, протопласти клеток переносили в отдельные культуральные сосуды объемом 250 мл, содержащие среду MS morpho. Сосуды инкубировали при 24°C в условиях 16 часов освещения (20 мкмоль $\text{m}^{-2}\text{сек}^{-1}$, лампы белого свечения Lumilux Osram L36 W/21) и 8 часов темноты. В пределах периода времени одной-двух недель были видны множественные побеги. Побеги переносили в культуральные сосуды объемом 250 мл, содержащие среду MS, после того, как они достигали длины 3-4 см. Культуральные сосуды объемом 250 мл инкубировали при 24°C в условия 16 часов освещения (20 мкмоль $\text{m}^{-2}\text{сек}^{-1}$, лампы белого свечения Lumilux Osram L36 W/21) и 8 часов темноты. Побеги поддерживали в культуральных сосудах, пока они не развивались в растеньица, и в это время их переносили в теплицу для выращивания до достижения зрелости.

ПРИМЕР 6: МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ИНТЕГРАЦИИ ЕТИР, СОДЕРЖАЩИХ Т-ДНК, В КАНОЛЕ

Геномную ДНК экстрагировали из ткани листа всех предполагаемых трансгенных растений, используя набор для экстракции ДНК растений DNEASY® 96 или мини-набор для растений DNEASY® Plant Mini Kit™ (Qiagen). Геномную ДНК из каждого растения анализировали в ПЦР, используя праймеры, сконструированные для амплификации

⁵ virC, прямой pTiC58 (SEQ ID NO: 150 CGAGAACTTGGCAATTCC) и обратный pTiC58 (SEQ ID NO: 151 TGGCGATTCTGAGATTCC), чтобы тестировать сохранение A. tumefaciens, праймеры, сконструированные для амплификации актина из *B. napus*; прямой актина (SEQ ID NO: 152 GACTCATCGTACTCTCCCTTCG) и обратный актина (SEQ ID NO: 153 GACTCATCGTACTCTCCCTTCG), чтобы проверить качество геномной ДНК.

¹⁰ Праймеры конструировали для амплификации гена hph; прямой HPH (SEQ ID NO: 154 TGTTGGTGGAAAGAGGATACG) и обратный HPH (SEQ ID NO: 155 ATCAGCAGCAGCGATAGC), кодируемые ETIP. Растения, которые не давали продукта с праймеров virC, но в случае которых амплифицировали продукты правильного размера с использованием праймеров к актину и hph, классифицировали как трансгенные.

¹⁵ Осуществляли второй скрининг, при котором гДНК из каждого трансгенного растения анализировали в ПЦР, используя пять наборов праймеров, сконструированных для амплификации бинарного вектора вне области Т-ДНК [(1F SEQ ID NO: 156 ATGTCCACTGGGTTCTGCC; 1R SEQ ID NO: 157 GAAGGAACTTATCCGGTCC) (2F SEQ ID NO: 158 TGCCTGCCATTCTCCAAAT; 2R SE ID NO: 159

²⁰ ACCGAGCTCGAATTCAATTC (3F SEQ ID NO: 160 CCTGCATTGGTTAACACC; 3R SEQ ID NO: 161 CCATCTGGCTCTGCCTTGC) (4F SEQ ID NO: 162 ATTCCGATCCCCAGGGCAGT; 4R SEQ ID NO: 163 GCCAACGTTGCAGCCTTGCT) (5F SEQ ID NO: 164 GCCCTGGGATGTTGTTAAGT; 5R SEQ ID NO: 165 GTAACTTAGGACTTGTGCGA)]. Считали, что растения, в случае которых

²⁵ амплифицировали ПЦР-продукты правильного и ожидаемого размера с использованием наборов праймеров 3 и 4, имеют интеграцию в осте.

ДНК из растений без интеграции в осте очищали из 20 г ткани листа, используя модифицированный способ СТАВ (Maguire et al., (1994) Plant Molecular Biology Reporter, 12(2): 106-109). Изолированную гДНК расщепляли несколькими ферментами рестрикции, и 10 мкг гДНК разделяли электрофорезом в агарозном геле и переносили на мембрану, используя стандартный протокол Саузерн-блоттинга. Мембранны исследовали с помощью зондов, используя систему DIG Easy Hyb System™ (Roche, South San Francisco, CA), следуя инструкциям производителя. Зонды к каждой кассете экспрессии, к ELP и к эндогенному контрольному гену актина амплифицировали с конструкцией ETIP, используя следующие праймеры: (IPT-F SEQ ID NO: 166 TCTCTACCTTGATGATCGG; IPT-R SEQ ID NO: 167 AACATCTGCTTAACCTCTGGC; dsRED-F SEQ ID NO: 168 ATGGCTTCATCTGAGAACG; dsRED-R SEQ ID NO: 169 TTCCGTATTGGAATTGAGG; PAT-F SEQ ID NO: 170 TTGCTTAAGTCTATGGAGGCG; PAT-R SEQ ID NO: 171 TGGGTAACTGGCCTAACTGG; ELP-F SEQ ID NO: 172 ATGATATGTAGACATAGTGGG; ³⁰ ELP-R SEQ ID NO: 173 AGGGTGTAAAGGTACTAGCC; Hph-F SEQ ID NO: 174 TGTTGGTGGAAAGAGGATACG; Hph-R SEQ ID NO: 175 ATCAGCAGCAGCGATAGC; актин-F SEQ ID NO: 176 GTGGAGAAGAACTACGAGCTACCC; актин-R SEQ ID NO: 177 GACTCATCGTACTCTCCCTTCG).

Последовательность ETIP амплифицировали и секвенировали из всех растений, ⁴⁵ содержащих только одну копию ETIP. Последовательность каждой вставки Т-ДНК анализировали прямым секвенированием продуктов ПЦР с использованием ABI3730xI™ (Applied Biosystems, Life Technologies). Вставку Т-ДНК амплифицировали с геномной ДНК, используя полимеразу Phusion Hot Start II (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific).

Реакции амплификации Т-ДНК осуществляли с использованием множественных пар праймеров, чтобы амплифицировать перекрывающиеся последовательности длиной приблизительно 2 т.п.н. Каждый продукт ПЦР секвенировали с использованием нескольких праймеров, чтобы обеспечить полное покрытие. Реакционные смеси для

- 5 ПЦР обрабатывали щелочной фосфатазой креветки и экзонуклеазой I (Applied Biosystems, Life Technologies), чтобы инактивировать избыток праймера перед реакцией ПЦР для секвенирования. Последовательности, фланкирующие вставку Т-ДНК каждой ETIP-линии с единичными копиями, идентифицировали, расщепляли очищенную геномную ДНК с использованием восьми эндонуклеаз рестрикции с последующим
- 10 лигирование двунитевых адаптеров, специфичных для выступающих концов, создаваемых эндонуклеазами рестрикции. После такой стадии лигирования осуществляли ПЦР с использованием биотинилированного праймера либо к 3'-, либо к 5'-концу ETIP и праймера к каждому адаптеру. Продукты ПЦР улавливали и очищали на шариках для обратимой иммобилизации на твердой фазе (SPRI) Ampure (Agencourt Bioscience
- 15 Coiporation, Beckman Coulter Company). Осуществляли гнездовую ПЦР, и все продукты секвенировали, используя секвенирование по Сэнгеру ABI и протокол цикла секвенирования BIG DYE TERMINATOR® v3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies). Данные о последовательностях собирали и анализировали, используя компьютерную программу SEQUENCHER™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI).

20 САУЗЕРН-БЛОТ-АНАЛИЗ

Были выбраны специфичные ферменты рестрикции для расщепления образцов гДНК перед Саузерн-анализом. Предполагаемые трансгенные растения анализировали, расщепляя геномную ДНК EcoRI и SwaI. Затем образцы расщепленной гДНК и неразрезанной гДНК анализировали, используя в качестве зондов любой из

- 25 полинуклеотидных фрагментов, содержащий элементы генов PATv6, IPT или ELP, так как такие фрагменты полинуклеотидных зондов обеспечивают дифференциацию множественных вставок в продуктах расщепления EcoRI, а также продуктах расщепления SwaI. Идентифицированные линии растений с одиночными копиями трансгенов дополнительно анализировали с использованием всех шести зондов, чтобы
- 30 идентифицировать присутствие всех важных элементов встроенного вектора.

Соответственно, было отобраны образцы для 67 независимых событий трансформации ETIP-pDAS000036 и тестированы в отношении присутствия трансгена (*hph*) и присутствия остова вектора. Из 67 тестированных растений в 47 обнаружено наличие трансгена, интегрированного в геном. Было обнаружено, что Из 47 трансгенных

- 35 растений 17 растений содержали остов вектора (таблица 14). Из остальных 30 растений, которые не содержали значительной части остова вектора (отсутствие *Ori* или *SpecR*), отбирали образцы для Саузерн-анализа. Как правило, растения сначала подвергали скринингу с использованием зонда IPT, и линии растений, идентифицированные как предполагаемые линии с одной копией, дополнительно тестировали, используя зонды,
- 40 содержащие элементы генов *dsRED*, *PAT*, *ELP* и *hph*, чтобы подтвердить присутствие полной кассеты.

Подобным образом, отбирали образцы для 52 независимых событий трансформации ETIP-pDAS000037 растений, выживших на почве, и тестировали в отношении присутствия трансгена (*hph*) и присутствия остова вектора. Было обнаружено, что из 52

- 45 тестированных растений 48 имели трансген, интегрированный в геном. Обнаружено, что из 48 трансгенных растений 23 растения также содержали остов вектора, и 3 растения не тестировали (таблица 14). Из остальных 22 растений, которые не содержали значительной части векторного остова (отсутствие *Ori* или *SpecR*), брали образцы для

Саузерн-анализа. Такие трансгенные растения сначала подвергали скринингу с использованием зонда IPT, и линии растений, идентифицированные как предполагаемые линии с одной копией, дополнительно тестировали, используя зонды к dsRED, PAT, ELP, hph и актину, чтобы подтвердить результаты. После идентификации 5 независимых линий с одной копией осуществляли Саузерн-анализ на остальных растениях. Всего Саузерн-анализу подвергали 11 линий ETIP-pDAS000037.

Таблица 14 Суммарные результаты ПЦР +/- трансгена и +/- векторного остава				
Подтверждение трансгена - конечная ПЦР				
	Независимые события в растениях, выживших на почве	Отобранные образцы для независимых событий	Тестируемые независимые события	Независимые события, позитивные по трансгену
10	pDAS000036	67	67	47
	pDAS000037	52	52	48
Присутствие остава - конечная ПЦР				
15	Тестируемые независимые события		Независимые события без Ori или Spec ^R	
	pDAS000036	47	30	
	pDAS000037	48	22	

РЕЗУЛЬТАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ В СЛУЧАЕ ТРАНСГЕННОЙ ПО ЕТИР КАНОЛЫ, ТРАНСФОРМИРОВАННОЙ PDAS000036 И PDAS000037

20 Трансгенные события *Brassica napus*, которые получали в результате трансформации pDAS000036 и pDAS000037, приводили к получению однокопийных полноразмерных инсерций Т-нити. Три-четыре события для каждого растения полностью характеризовали и предположительно картировали в конкретных хромосомах в геноме *Brassica napus*. Хотя происходило несколько перестроек отдельных пар оснований во время интеграции 25 Т-нити, в случае выбранных событий растения содержали полноразмерные кассеты экспрессии, которые способны давать устойчивую экспрессию трансгена. Отобранные растения T₀ с такими событиями выращивали до стадии развития T₁. T₁ подвергали повторному скринингу, используя описанные выше ПЦР-анализы, чтобы определить зиготность интегрированной Т-нити. Подвергнутые скринингу события 30 классифицировали как гомозиготные, гемизиготные или нулевые.

Последовательность ETIP амплифицировали и секвенировали из всех растений с трансгенными событиями, содержащих только одну копию интегрированной последовательности ETIP. Последовательность каждой вставки Т-ДНК анализировали прямым секвенированием продуктов ПЦР. Вставку Т-ДНК амплифицировали с геномной 35 ДНК, используя полимеразу Phusion Hot Start II (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific). Затем Т-ДНК амплифицировали с использованием множественных пар праймеров, чтобы амплифицировать перекрывающиеся последовательности длиной приблизительно 2 т.п.н. Каждый продукт ПЦР секвенировали с использованием нескольких праймеров, чтобы обеспечить полное покрытие. Реакционные смеси для ПЦР обрабатывали 40 щелочной фосфатазой креветки и экзонуклеазой I (Applied Biosystems, Life Technologies), чтобы инактивировать избыток праймера перед реакцией ПЦР для секвенирования.

Последовательности, фланкирующие вставку Т-ДНК каждой ETIP-линии с единичными копиями, идентифицировали, расщепляли очищенную геномную ДНК с использованием восьми эндонуклеаз рестрикции с последующим лигированием 45 двунитевых адаптеров, специфичных для выступающих концов, создаваемых эндонуклеазами рестрикции. После такой стадии осуществляли ПЦР с использованием биотинилированного праймера либо к 3'-, либо к 5'-концу ETIP и праймера к каждому адаптеру. Продукты ПЦР улавливали и очищали на шариках для обратимой

иммобилизации на твердой фазе (SPRI) Ampure (Agencourt Bioscience Corporation, Beckman Coulter Company). Осуществляли гнездовую ПЦР, и все продукты секвенировали, используя секвенирование по Сэнгеру ABI и протокол цикла секвенирования BIG DYE TERMINATOR® v3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies). Данные о

- 5 последовательностях собирали и анализировали, используя компьютерную программу SEQUENCHER™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI). Восемь линий ETIP было
иdentифицировано и отобрано для анализа фланкирующих последовательностей (таблица 15). Левые и правые фланкирующие последовательности (также описанные как последовательности границ или соединительные последовательности) представлены
10 в виде SEQ ID NO: 431 - SEQ ID NO: 446, подчеркнутые последовательности показывают плазмидный вектор, неподчеркнутые последовательности показывают геномную фланкирующую последовательность.

Таблица 15 Подробное описание однокопийных событий, используемых в исследованиях фланкирующих последовательностей.					
	Описание плазмида	Название события	Код	Левая граница SEQ ID NO:	Правая граница SEQ ID NO:
15 pDAS000036	em02-5788-1-1	228688	431	432	
	ad58-5784-2-1	232502	433	434	
	ad58-5898-10-1	237143	435	436	
20 pDAS000037	lf31-6139-2-3	234576	437	438	
	bm56-6315-1-1	234703	439	440	
	ad58-6372-1-1	240653	441	442	
	ad58-6620-4-1	242268	443	444	
	ad58-6620-17-1	242293	445	446	

- 25 Подробное описание pDAS000036: левая фланкирующая граница em02-5788-1-1 (SEQ ID NO: 431)

TCGAGATTGTGCTGAAGTAAACCATTTACTTCAAATCTATTTAACTATTTACTTT
ATTAAGGAGAGAAACTTGCTGATTAATTCAAATTAGTAGCATTAAGATTCCAAAGATTCCGA
TTTAGAAAAGTCAAAGATTCAAAGAACAAAGTCTAGGTCTCATGGCTCATGTTGCATCCGATTC
30 ACCATCCACTCATTTCATATCTTCCTCCACTGTCTCTAGAAACAACTCATTAAATTAGA
AAACTCCTTTCAATTAGAAATATTAAAGTTATCACAATGTATCAATTAAATTATCCGA
TGACTCATTGATAGTCAGGACCTTGCTGTCGTCCGTAATTATTATTCATAACAAAC

35

40

45

AAATATATGTTCACTCAGAAAATTACGGCGCAATCATCTAATTTGTGGACAAAATAAATAGC
 GTAGCTTCGAGATTCAAAGTTGTTCAAATTAAATTGATTTCCGTCCTCGTATACTCTT
 TTATGTATAGAAAATAATAATCCACTACTAGTAGTGATAACTACATTACATATATTAAAAT
 5 TATGATGTCACATTGCGGACGTTTAATGTA
TACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTAGCTGAGCTGGATC

Левая фланкирующая граница em02-5788-1-1 (SEQ ID NO: 432)

CATAACCACCATCTAAACAATAGAACCTCCTAAGTGAAGCAATGACTCAAATCTACT
 10 TGAAGGCATGGAGTATAAGCCATGTTCTTCAGAGGGACTGTACTCTGTAGATTACTTC
CTCATTAACCAGATCTGGCCGGCTACCCAGCTTCTTGACACATAGCGACCGAGCTCGAGCC
GAAGTTCGGTCGCTGTTCACTGTTGGAAAGCATCAGTAACGCAGAAGACATAATTAAAAT
TAATTATATATGGTAGTTCTAGATTCTCACTATACTCATTGTGATTGAAAAACAACAT
 15 ATATATATATATATGTATTAAAATTAAGAAATCATTAAATCGTACCAATGCAGAAAAC
TTATAAGTCCTATTCTTTGTCAGATGAGTAGATGACACATCATGTACCAACATAACC
ATAATGGTGCATAACCACCAAAACTTAATTAGAAACTAATTAAAATTTGGTAGTTAAGA
 20 TTCCCTCTAATGGTTGTCAAAAAAAAAGATTCCCTTAATACATGGTAGAATATTTTT
GAGTTAAAATGAAAGTAAATCTCAAATTAGTCATAAGGAAATTCTAAAAACATCGACTTC
TTTATAAGATCCCATTGTAATTAGATGATTAATTTCATCCAATCCAATTAAAGAATTGTAC
ACATCGGCCTCTATATATCAAACACACCTAAAA

Подробное описание события PDAS000036: левая фланкирующая

25 ad58-5784-2-1 (SEQ ID NO: 433)

CGATTGAGCTATAATCAATCACACCTTATCGTTCTTCAAAGAAAAATGAAAGTTG
TAAAACTTATCAGCCTGTGAGTGATTATTCAATTGATAAAAGAAAAAAAAGGCTTAGCTT
 30 ATTTGGTTTTGTTACAATCTGATTAATTAGATTAGCACTCTGATTCTAGCGAACATGA
GAGTGGTCCATCAAACCTCAGACAGTGAGCACAGTGGTGCAGCAAACCATTGGTGAGAGC
TCTTCAGTTCTTGCTATTAGCTGGTCTGGCTCTCTTCAAGAAGCTGCTCTCAAGCTG
CCTCTTGTACCTTCTGTTCCGAGGTAACTAACATTCTCATTTGTCCTTTCTTGT
 35 GGGTCTTAAATGTTYGCTTTCTTATAGGTACTGTTGCTGATTCAAGATAGATTGAGTAC
CCTTAGCTGAACCTGGCTAAACTGGTGACTTGTGCAACAAAGAGATTACTCTCAC
TCCTTGCCTTCTAGCTATTGGCAAGAACATACTCCCTAGACAACTTAATAACACATT
GCAGCTTTAATGTA
 40 CTAGAGTC

Правая фланкирующая граница ad58-5784-2-1 (SEQ ID NO: 434)

CCTGTACCAACCACATCTAAACAATAGAACCTCCTAAGTGAAGCAATGACTCAAAT
CTACTTGAGGCATGGAGTATAAGCCATGTTCTTCAGAGGGACTGTACTCTGTAGATTAC
 45 TTTCCCTCATTAACCAGATCTGGCCGGCTACCCAGCTTCTTGACAAAGTGGTATAAAACTA
TCGCCGGCCTACCTCGCGTTGCTCTTTAGATGTCCTCTGTACTGATGTTGTCAAAAT

CTTAGGATCCAATGAGTTATCAGGTATACTTCTATCATGTATTGCTTGAGATTTGGAGTGT
 AGTAAAGATTCATAAAAAGAATTTCCTAAACAAAATTTGGGGCTTGAAGCTAATGTTGG
 AAATATGTAACGGAGTTAAATCTTGGCAGGCCTATATATGCGGAAACGCCCTGTGTAGAG
 5 TTCGCTATACTGGTGTGGCCTTGTGTGACTATTAGAACTACATCTTCCCTGTTACCCC
 AATAACTGAGTCAAAGAAAGCTACTATCTCAGATTGATCTCGAAATTCAAAGAAGGTTG
 TTTAGTATTATTCTCTTGTGCATAGCCTTTGCTTTTTTATAAAAAAAAGTTGAGTA
 TGCTTATTGCCATTGCA

10 Подробное описание события pDAS000036: левая фланкирующая граница ad58-5898-10-1 (SEQ ID NO: 435)

TAATTCATTTCGTCATTTGGTAAAGTAACAAAAGACAGAATATTGGTTAGTCGTGT
 TGTTAGGAATAAAATAAGAACGTGGACATCGTGAATAAAATATTCAAGACAAGGAAACTAA
 15 CAATAAAACAGTAATGAACATGGTTCTGAATCTCATCTTGTGTATCTCAATGGAATCCACCG
 CCACGAATCAGACTCCTCTCCAAGCTCCACCGTCGACGATGACAATGGCAGGGTGTATAC
 CGACGAATTTACCAAACACCCCCGGACCCGGGATCCTCTAGAGTCAACAAATTGACGCTTAG
 20 ACAACTTAATAAACACATTGCGGACGTTTAATGTATGAATTAAACGCCGAATTGAATTGAGC
TCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTAGCTGAGCTGGATCA
GATTGTC

Правая фланкирующая граница ad58-5898-10-1 (SEQ ID NO: 436)

CGGCCTACCCAGCTTCTGTACAAAGTGGTGATAAAACTATCAGTGTGATTAAAGAT
 AAAATTGATTTCATTACATAATAATCCATTAAATTTCACGCACGTGGAACCCATTGGTGT
 ACTTCCACGTCTCTAAGAGAGCACTGACCCACTCATAAAAAGATAACATCTTATAAGCCCT
 TCATCGTCACACAGACACACACTTCCCTCTCAATTATTCCATATTCTCTAATTCTAATTGTT
 ACACCTCAACACATTAGATTGTAACAAACAAAACGATTAGCTCCAAAGCCTAAGCTTTATT
 30 TCCTTATAATTTCCTGGTTCTCTCTATAAGAATGCAAATGACTGAGAGAGGCCAGCCA
 TGTGGCACACGTCCCTAGCCTCGCATTCCGCACAGCTCTAGCTGCACAATCGTGGTGC
 TACGCTCTACGGACCCGAGTGGATCCTCCGTTGTGGCATCCGGCTTCTACGTCACG
 GTCATTCTCATCATTACGGACGCCACGCTAGGCGACACACTACGTGGCTGGCTAGCCCTT
 35 ACGCCACATGTCAGAGCGTTGCACCGGCTATCATTACACTAAGGCTTATAGGACCAGCTGGCT
 CACGGCCGG

Подобное описание события pDAS000037: левая фланкирующая граница H31-6139-2-3 (SEQ ID NO: 437)

40 TTTCTTCCATCAGTTCTCGGCACCTCCTGGCTCTCGTCTATCTTCTTCCATCC
 CGGCCCATCTCGTACACATTCCACCCAACTACACAAACACGTTATAGTCTTTACATTATGACC
 AAATCAACCTAAAGATAACGCCTTATAAAAATATAGGGGTCAAAGCAAAGAAGAGAAAGTT
 TGCTTACAGTGTGGAGAAAAGAAGTTGGAAGATGAGGAGTAAGAAGAAGAGAAAG
 45 GTCTTCTGATGAGGAATAGGAGATAAGGTGGAACTGGAATGTTGCCGCTAAATACTTGAAGAC

AAGAGCTTCAAGCTCTCCCATTGTGACTCAGTGAAAGGGATCCTAGTCGTATGAAG
 AGATAGAGAAAATTGATGATGAAGGAGGTCTGATGAAGAGAAGAGAGAGAGAGATATTACAC
 AAAGAGGGTTGTATTGAAAATTGAAAGTAGAGAGAGTAGTAGGTAAGTTTATTAATAAT
 5 GTTGTTCACACCTGCAGTCTGCAGAAATTGTGGTGTGAACAAATTGACGTTAGACAACCTAA
 TAACACATTGCGGACGTTTTAATGTACTGAATTACGCCATTGAATTGAGCTCGGTACCC
 GGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTA

Правая фланкирующая граница If31-6139-2-3 (SEQ ID NO: 438)

10 TTCAATCTACTTGAAGGCATGGAGTATAAGCCATGTTCTTCAGAGGGACTGTACTT
CTGTAGATTACTTCCCTCATTAACCAGATCTGGCCGGCTACCCAGCTTCTGTACAAAGTG
GTGATAAACTATCAGTGTGAAACATATATACGCATAATATTCTCAGAACCCGACCCATTGG
TTGACTCGGATCAAGATCGACCCGATCCGACCCGGTTAAAAGCACGTCGTCTCCTTGTTCGC
 15 CCCTTATATTGACGAGTGAGTCGATTGGATCGCTGTTGTCATTCTCACTACCTTAAGAAA
AAAAAAAAGGTGCGTCTCTCTCACCTTACCGCTCACCTACCTCAGATCTGACATCGATT
TTCCAAATCTC : TCCAGGTACTCTCTCCCTGGCCGTTGACGGTCCCGTCCGGCCGTGGATC
 20 TGATTCGCCCGATCTGAGGTCAAGCATGGCGCAGCTAACGCCCCATCACGATGAAGGAGG
TCCTAACGGTGAGTCCCGCCTCCATTAGTAACATA

Подробное описание события PDAS000037: левая фланкирующая граница bm56-6315-1-1 (SEQ ID NO: 439)

25 TACATCGCGATTCATCCTGGTTGATTAGAATGACGAGGAAGTTGTATATTCCAAAC
AGGAAAATTGGGATCGCCTTATTGAAAGTGGATAACTTCTTCATCTTAATTCTTATGAGAAT
TATTCCACTTCCCTGGTATTCTCCACTACTTTGTATATAAATACAGCTTCTACATCGCGAT
TCATCCTGATTGATTAGAATGACGAGAAAGTTGTATATTCCAAACAGGAAAATGGGATCA
 30 CCTGATTTGAAAGTGGATAACTTCTTCATCCTAATTCTTATGAGATTATTCCACTTCTGGT
GATTCTCCACTTCTTATGTATCAAATACATCTTACATCGCGATTCTGTTGATT
AGAATGACGAGGAAGTTGTATATTCCAAACATGAAAATGGAAAGTGGATTGACGCTTAG
ACAACTTAATAAACACATTGCGGACGTTTAATGTACTGAATTACGCCATTGAATTGAGC
 35 TCGGTACCCGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTAGCTTGAGCTTGAT

Правая фланкирующая граница bm56-6315-1-1 (SEQ ID NO: 440)

40 CCACCATCTAAACAATAGAACTTCTTAAGTGAAGCAATGACTTCAAATCTACTTGAAG
GCATGGAGTATAAGCCATGTTCTTCAGAGGGACTGTACTCTGTAGATTACTTCCCTCAT
TAACCAGATCTGGCCGGCTACCCAGCTTCTGTACAAAGTGAACGATAAAACTATCAGTCTTC
AAAGCGCATCTATGGCTAGTCATCACGGTTTAACTGTTTACGAAGTCGCGAGAGGCTCGT
CTTCTCCCTAGGATAAAACTGCAGAGGTGACATCGGAGGTTCTCGATCTAGAACATAGAGTA
CTGTTGAGAAAATCCGAGGCGAGTTGGCGAAACTCCCTATAGAGTTTCTTAGACAAGAG
 45 AACCACTCAAGCGCTGTTCGCGAGGTTCTCGACGAAGAGGCGCATTGCCGGCATCTCTT
CTCTATTTAAACTTGGCTCTTCCATCGCGATCTGGAAAGCCTGCAAGTGTGCCTAGGATC

GGTTGTACCATCGTAAGGAGCCACTTGACTTATCAGGATCCGAAACCGTAGTTCGGTGATG
 CGGGTGGTGAAGGGCGTTTCGAGACTCCTCGAGGAGTAGGGTGATATCGAGTGCAGTACTAG
 TAGCGTGATGATTGGGATTCACCGCTAACCTCCGCAGCGTTCA

5 Подробное описание события PDAS000037: левая фланкирующая граница ad58-6372-1-1 (SEQ ID NO: 441)

TTTTACAGTGTAGAAGAAGTGGATGAAGCTGAAATTGAATTTCAAACTCGTTCAGCT
 TGACTAGAGGTGGAGAGAGTCAAAGCCTCCCCTCAAGTACCAAAACATGGAATAGAAGACAGT
 10 CCGAGGGAGAGGAAACCCTGGCCGACGAGGCCGTGGCTCCTATCATTAACTAGTGTCTTCTTA
 CTATTAATGGTTATTAAGTCTCAGCCTTGTGTTCATTGGTTGAGATTCACTCATACATG
 AACACTTGTTCATTCCAGCTTCCAAACTATAAGAATATTCCAATCTTATCTTGTAAAGT
 TAAGTTTAAATTGAAAGCCCTAGTTCAAAAAACAAAAAAAAAAATTAGCCCTTGAATT
 15 ATATAATCACGACGGCCATATTGGCAGCTACACTGATATGTTCAATTGGCTGACAGGCCTT
 GAGCAGGGTTGCTGGGTATATTGGTAGGAAGATGTGTTGCGAGGTTGAAGCCTCATTAGGCA
 ATATAAACATGATCATTAGCGTTATGTCATTAGTTACTTACGTAGACTAAGTAACCCACT
 AAAGGTTGCTGATTCCCTTGTATCGACTAACACATTGCGGACGTTTAATGTAATTAA
 20 CGCCGAATTGAATTGAGCTCGGTACCCGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGC
TTAGCTTGAGCTGGATCAGATTGTCGTTCCCGC

Правая фланкирующая граница ad58-6372-1-1 (SEQ ID NO: 442)

CATGTTCTTCAGAGGGACTGTACTTCTGTAGATTACTTCCCTCATTAACCAGATC
 25 TGGCCGGCCTACCCAGCTTCTGTACAAAGTGGTGATAAAACTATCAGTGTGACTGAATT
 AATTCTAATTTGTAAAAAATTGTATAACCTCAAATTATTAAAAGGCGGATTTATTAGAA
 TTATAACTAAATTATCTATAACTCCAAAATTGTACAATCATGTCATATCTTATT
 30 TTGCTAAATTATCATGTCATATCTTCTTCTTCCAAACTTACTTGAGACTAAAGTCTTAA
 TAAATTGTAGGAGTTCCACACACAAACAAAAACAAATATTTCATCAAGGGATAC
 TTATTTAACATCACGGATTCACAGTTATTAACAAAATCCAAACAAAGACTGAAAGACAGAAG
 ATTCAATCTAACAAATAGTCGGCAAACACCAGTGATTAACGAAATAATTAAACAAGTGGTC
 35 AGATCTCGGGAAA

Подробное описание события PDAS000037: левая фланкирующая граница ad58-6620-4-1 (SEQ ID NO: 443)

TAATTTCATTTCGTCATTTGGTAAAGTAACAAAAGACAGAATATTGGTTAGTCGTGT
 40 TGGTTAGGAATAAAATAAGAACGTGGACATCGTGGATAAAATATTCAAGACAAGGAAACTAA
 CAATAAAACAGTAATGAACATGGTCTGAATCTCATCTTGTGTATCTCAATGGAATCCACCG
 CCACGAATCAGACTCCTCTCAAGCTCCACCGTCGACGATGACAATGGCGACGGTGTCTATAC
 CGACGAATTACCAAACCTACCCCCGGACCCGGGATCCTCTAGAGTCACAAATTGACGCTTAG
 45 ACAACTTAATAACACATTGCGGACGTTTAATGTAATTGAACTAACGCCAATTGAATTGAGC
TCGGTACCCGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTAGCTTGAGCTTGATCA

GATTGTC

Правая фланкирующая граница ad58-6620-4-1 (SEQ ID NO: 444)

CATAACCACCATCTCAAACAATAGAACTTCCCTAAGTGAAGCAATGACTTCAAATCTACT

5 TGAAGGCATGGAGTATAAGCCATGTTCCCTTCAGAGGGGACTGTACTTCTGTAGATTACTTCC
CTCATTAAACCAGATCTGGCCGGCCTACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTGATAAAACTATCAGT
GTTTGAATAATCGGATATTAATTTCTTAGACAGTTCAATTAGTAGTTGATCTAACATTCA
CGTTTATTTCTTCTTGAATGCTAGACTCTAGTTGGTACCCATAGGATTGAGTTAC
10 ATGAAGCTATTGACACTGGGAGTGCTCAAGATCTGTAAGAGGCCAAAGATTACAAACAGAACG
TGATTCTTGATAGTGTGAGATTGTGATAAGAACAGCATGAGTATTACTTTACTGCC
CCTGCTGTGGTGAAGACATCACAAAACAGTCAGCTCGTGAAGAAATCAGATATTCAACCCGC
15 AAAAAAATCTGACAATGCAAATAAACCTATTGACACTAAGAATGGTCAAGATCCGAAGACAAG
AAGACAAAAAATTTGTCTGGCTCCCTGCTTATCTCCAGAAGCTGTTCTTCTGTTATGGCC
ACATCAAAGACAAAGGTACCCCTTCTTGGTGCCTTGGTGTGGACAGGTGTGATTGACTTG
GTTTCTGGCAGATTCAAGAGATAGAGGTTGATTCAAAGTCAACTAACAAATGATCTTGGTAC
20 CAATAGTGAGGA

20 Подробное описание события PDAS000037: левая фланкирующая граница ad58-6620-17-1 (SEQ ID NO: 445)

CCGCCTTGAACAAACGCTCCGCCGTGCTCAGTACATTATCGAGGTTACAAAAAGTTC

25 AATCCTTATGCTTGGCGTGTGATTGTTACGAATGAGTAAAATTGATTGGTTTTTT
CTTGAAACAGCATGGTGGAGATGTGAATGCGACGGATCATACGGGGCAGACTGCGTTGCATTGG
AGTGCGGTCGTGGTGCCTGCAAGTTGCGGAGCTTGTCAAGAGGGTGCAGGGTTGATG
CTACGGATATGTATGGATATCAGGTTCTAACCACTCCCTTTCTTGTGGAGATTGTCTTTT
30 GTTTCAATGCTAGTCAACTTCTTCTTCAACAAACTAAGTAGTATTGCTTGTGTTGTTG
TCGTTGCATTCTTCTTATGGCTGTGTTCTGAGGTTCATGTAGGTATATAAGCACTCGTACTT
TGCCACTTGTTCATTAGGCAACATTGTGCACATATCTAAGTAGTTGGCTTGTAAATTAG
TTTGTGTTGTCTCAAAGTATATTGAGCAGTTCATGACTCATTATTCAAAGGTTGTCTAAATT
35 AGAGAGAACTTCATTTCCTGGATTAAATCAGCATTTAGAATGTTATAGCGATATCATT
TAGTTGAAAAAATCTCAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTAATAACACATTGCGGACGTTTAA
ATGTAATGAACTAACGCCATTGAATTGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCT
GCAGGCATGCAAGCTTAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTC

40 Правая фланкирующая граница ad58-6620-17-1 (SEQ ID NO: 446)

GTATAAGCCATGTTCCCTTCAGAGGGGACTGTACTTCTGTAGATTACTTCCCTCATTAA

45 ACCAAGATCTGGCCGGCCTACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTGATAAAACTATCAGTGTAGAT
CCCCGACCGACCGCCATCCTGGACGGCCTCGTGCATGCTGATGTTGTCAAATCTTAGGATCC
AATGAGTTATCAGGTATACTTCTATCATGTATTGCTTGAGATTGGAGTGTAGTAAAGATT
TCAATAAAAGAATTTCAAACAAATTGGGGCTTGAAGCTAATGTTGGAAATATGTAA

CGGAGTTAAATCTTGGCAGGCCTATATGCAGGGAAACGCCCTGTGTAGAGTCGCTATAC
 TGGTGCTGGTCCTTGTGTGACTATTAGAACTACATCTTCCCTGTTACCCCAATAACTGAG
 TCAAAGAAAGCTACTATCTCAGATTGATCTCGAAATTCAAAGAAGGTTGTTAGTATTA
 5 TTCTCTTGTGCATAGCCTTTGSTTTTTTTTATAAAAAAGTTGAGTATGCTTATTGC
 CCATTGC

КАРТИРОВАНИЕ ETIP

Для каждого трансгенного события, которое заключалось в инсерции одной копии ETIP, была взята фланкирующая последовательность после сборки вручную и использована в качестве запроса в локальном BLAST-анализе. Всего таким способом идентифицировали восемь растений, которые имели интеграции единичной копии (таблица 16 и таблица 17). Набор из 595478 последовательностей, полученных с использованием методики «дробовика» из генома *Brassica oleracea*, загружали из базы данных NCBI GSS и форматировали в виде базы данных нуклеотидных последовательностей BLAST. Затем фланкирующие ETIP последовательности сравнивали в BLASTn с базой данных, и все совпадения исследовали вручную. Затем выбирали наиболее значительное совпадение последовательности с фланкирующей последовательностью ETIP из базы данных для *B. oleracea* и выравнивали с доступной онлайн геномной последовательностью *Brassica rapa* (<http://brassicadb.org/brad/blastPage.php>), при этом также находили положение в геноме, которое имело наиболее значительное совпадение последовательности. В тех случаях, когда только 5'- или 3'-фланкирующие последовательности имели значительное совпадения с геномными последовательностями *B. oleracea*, полагали, что не поддающаяся выравниванию или несовпадающая последовательность либо связана с идентификацией отсутствия последовательности в базе данных, либо имели место значительные перестройки генома, возникающие во время интеграции ETIP. В случае образцов, которые дают значимые совпадения в BLASTn при анализе фланкирующей последовательности ETIP, наиболее значительно совпадающую последовательность *B. oleracea* GSS наряду с наиболее значимо совпадающей последовательностью из генома *B. rapa* затем выравнивали вручную в компьютерной программе SequencherTM (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI) для каждого из растений с единичной копией ETIP. Затем сравнивали три последовательности и наиболее сходную последовательность из любого из диплоидных видов *Brassica*, сравниваемую с фланкирующей ETIP, определяли как геном, в котором расположен ETIP. В случае большинства образцов существовала значимая вариабельность между двумя последовательностями диплоидного генома *Brassica*, и для полученной из *B. rapa* фланкирующей последовательности ETIP наблюдали преобладающую ассоциацию с одной или другой из диплоидных последовательностей. Однако были случаи, когда была недостаточная вариабельность последовательностей между диплоидами, и оценка группы сцепления могла быть возможна, но оценка субгенома была невозможной. Затем предполагали специфичную локализацию в геноме на основании расположения геномной последовательности *Brassica rapa*. В случаях, когда ETIP идентифицировали как интегрированный в геном С *B. oleracea*, использовали сравнительную синтению между диплоидными геномами *Brassica*, описанную Parkin et al. (Genetics 2005, 171: 765-781), чтобы экстраполировать геномное положение в субгеноме С *Brassica napus*. Кроме того, идентифицированные последовательности сравнивали в BLASTn с кодирующими последовательностями геномов *Arabidopsis thaliana* (CDS TAIR 9, загруженными с сайта <http://Arabidopsis.org/index.jsp>) и

иdentificirovali любые нарушенные генные последовательности, а также подтверждали положения в геноме, следуя синтезии *Arabidopsis-Brassica*, описанной Schranz et al. (Trend in Plant Science 2006, 11, 11: 535-542).

Таблица 16 BLAST-поиск и предполагаемое положение указанных выше последовательностей (предполагаемые положения в геноме <i>Brassica napus</i>)				
Событие/ Название вектора	Одна копия каждой кассеты, выявленная в Саузерн-анализе	Фланкирующая последовательность LB	Фланкирующая последовательность RB	Предполагаемое положение
pDAS000036				
em02-5788-1-1 228688	да	да	да	A6
ad58-5784-2-1 232502	да	да	да	A8
ad58-5898-10-1 237143	да	да	да	C7
pDAS000037				
lf31-6139-2-3 234576	да	да	да	A5
bm56-6315-1-1 234703	да	да	да	Геномный повтор
ad58-6372-1-1 240653	да	да	да	A/C8
ad58-6620-4-1 242268	да	да	да	C1
ad58-6620-17-1 242293	да	да	да	A/C 3 или 8

Таблица 17

Описание растений, содержащих одну копию ETIP, полученных с использованием двух конструкций pDAS000036 и 37, BLASTn приводит к получению базы данных о геномных последовательностях *Brassica oleracea*, потенциальное нарушение геномной последовательности, идентифицированное посредством сравнения генов *Arabidopsis thaliana* и предполагаемого положения в геноме

pDAS000036	BLASTn-совпадение с геномом С	Предполагаемый нарушенный ген	Предполагаемое положение
em02-5788-1-1 228688	Только значение левой границы e-175	At3g30775: пролиноксидаза	A6
ad58-5784-2-1 232502	только значение левой границы e-134	At1g50940: переносчик электронов флавопротеин альфа	A8
ad58-5898-10-1 237143	левая граница, образуемая двумя значимыми совпадениями при значении 0 и e-107	нет значимого совпадения с геном <i>Arabidopsis</i>	C7
pDAS000037			
lf31-6139-2-3 234576	только значение правой границы e-105	At3g08530: Клатрин	A5
bm56-6315-1-1 234703	обе границы имели большое количество совпадений, e-значение 0	НЕ АНАЛИЗИРОВАЛИ	Геномный повтор
ad58-6372-1-1 240653	значение левой и правой границы e-103 и -80	нет значимого совпадения с генами <i>Arabidopsis</i>	неоднозначное положение: субгеном А или С в группе сцепления 8
ad58-6620-4-1 242268	значение левой и правой границы e-154 и e-48	At4g27860: вакуолярный переносчик	C1
ad58-6620-17-1 242293	значение левой и правой границы e-167 и e-94	Идентифицированные границы At5g20340 и At1g50930	неоднозначное положение: возможно субгеном А или С и группа сцепления 3 или 8

Гомозиготные события использовали для получения протопластов с применением описанного ранее способа. Затем протопласти котрансформировали нуклеазой с цинковым пальцем, которая предназначена для целенаправленного воздействия на сайт связывания цинкового пальца, который включен в последовательность ETIP и донорную плазмиду, которая обладает гомологией с конкретными областями ETIP. Нуклеаза с цинковым пальцем расщепляет локус ETIP, и донорная плазмода интегрируется в геном клеток *Brassica napus* посредством зависимой от гомологии reparации. В результате интеграции донорной плазмиды неполный трансген DS-red

репарируется до полноразмерного трансгена DS-red. После этого экспрессию полностью функционального трансгена DS-red использовали для сортировки протопластов клеток способом FACS. Предполагаемые трансгенные растения отсортировывали, используя способ FACS, описанный в примере 7, и изолированные протопласти регенерировали в зрелые растения. Интеграцию донорной плазиды подтверждали в растениях с целенаправленно введенной ETIP, используя молекулярные способы подтверждения. Соответственно, локус ETIP служит в качестве сайт-специфичного локуса для целенаправленной интеграции в ген донорной полинуклеотидной последовательности.

Положения таргетинга в геном обеспечивают такие положения генома, которые не

изменяют нормальный фенотип растения. Полученные в результате события, когда трансген целенаправленно вводят в ETIP, не приводят к агрономически значимым непредусмотренным различиям, которые могут быть выявлены при сравнении событий ETIP с контрольными растениями. Кроме того, уровни экспрессии белка с трансгенами, интегрированных в локус ETIP, устойчивы и сопоставимы и стабильны во множестве геномных положений. Раскрытие геномные последовательности SEQ ID NO: 431 - SEQ ID NO: 446 обеспечивают положения в геноме Brassica, которые могут быть мишениями для интеграции кассет экспрессии генов, содержащих трансген.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ИНТЕГРАЦИИ ETIP В FAD2A КАНОЛЫ

Геномную ДНК экстрагировали из ткани листа всех предполагаемых трансгенных

растений, используя набор DNeasy Plant Mini KitTM (Qiagen), следуя инструкциям производителя, за исключением того, что ткань элюировали в 80 мкл буфера AE. Тридцать миллиграмм ткани молодых листьев от регенерированных растений мгновенно замораживали в жидкому азоту перед измельчением в порошок.

Молекулярную характеристику локуса FAD2A осуществляли, используя три независимых анализа. Анализы планировали и оптимизировали, используя следующие контроли: охарактеризованные трансгенные события с одним случайно интегрированным трансгеном, охарактеризованное трансгенное событие с пятью случайно интегрированными трансгенами, растения канолы дикого типа с.в. DH 12075 и нематричные контрольные реакции. Результаты трех следующих молекулярных анализов оценивали вместе, чтобы получить доказательство интеграции ETIP в FAD2A посредством HDR.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИНТЕГРАЦИИ ТРАНСГЕНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Четыре повтора каждого растения анализировали, используя праймеры, специфичные к гену-мишени hph (также описанный как hpt) (SEQ ID NO: 447, hpt F791 5'

CTTACATGCTTAGGATCGGACTTG 3'; SEQ ID NO: 448, hpt R909 5'

AGTTCCAGCACCAGATCTAACG 3'; SEQ ID NO: 449, hpt Taqman 872 5'

CCCTGAGCCCAAGCAGCATCATCG 3' FAM) (фиг.31) и эталонному гену, кодирующему белок группы с высокой подвижностью I/Y (HMG I/Y) (SEQ ID NO: 450, F 5'

CGGAGAGGGCGTGGAAAGG 3'; SEQ ID NO: 451, R 5' TTCGATTGCTACAGCGTCAAC

3'; SEQ ID NO: 452, зонд 5' AGGCACCATCGCAGGCTTCGCT 3' HEX). Реакции амплификации осуществляли, используя следующие условия: 95°C в течение 10 минут с последующими 40 циклами при 95°C в течение 30 секунд, при 60°C в течение 1 минуты, при этом данные об амплификации собирали в конце каждой стадии отжига. Количество копий вычисляли, используя способ ΔCq, где $\Delta Cq = Cq(\text{гена-мишени}) - Cq(\text{эталонного гена})$. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 2001. 25(4): p. 402-8. Растения с амплификацией hph и HMG I/Y и количеством копий 0,5 или больше считали

трансгенными, тогда как растения с количеством копий $\geq 0,5$ и $\leq 1,2$ предположительно считал однокопийными. Амплификацию осуществляли, используя систему детекции ПЦР в реальном времени BioRad CFX96 Touch™ и набор FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche, Basel, Switzerland).

5 ВЫЯВЛЕНИЕ НАРУШЕННОГО САЙТА ZNF FAD2A

Каждое растение анализировали в отношении присутствия или отсутствия амплификации эндогенной мишени в teste нарушенного локуса, который представляет собой анализ доминантов. Анализ представляет собой кПЦР-анализ с использованием SYBR® Green I и проводимый в синглплексном формате, но с проведением каждой 10 реакцией одновременно в одном и том же планшете для ПЦР, и нацелен на эндогенный локус (FAD2A/2C.RB.UnE.F1, SEQ ID NO: 453, 5' CTTCCAACTCCTCCTCGT*C 3' и FAD2A/2C.RB.UnE.R1, 5' SEQ ID NO: 454, GCGTCCCAAAGGGTTGTTGA*G 3') и локус ZFN (локус, в котором ZFN pDAB104010 связывается и разрезает геном) (FAD2A.UnE.F1, SEQ ID NO: 455, 5' TCTCTACTGGGCCTGCCAGGG*C 3' и FAD2A.UnE.R1, SEQ ID NO: 15 456, 5' CCCCGAGACGTTGAAGGCTAAGTACAA*A 3') (фиг.32). Обе пары праймеров амплифицировали, используя следующие условия: 98°C в течение 30 секунд с последующими 35 циклами (98°C в течение 10 секунд, 65°C в течение 20 секунд, 72°C в течение 90 секунд), затем 95°C в течение 10 секунд, затем анализ плавления от 50°C до 95°C с шагом 0,5°C в течение 0,05 секунд, и планшет считывали на каждом шаге. Условия 20 реакции перечислены в таблице 18.

Таблица 18
Реагирующие компоненты в одной реакции и концентрации для ПЦР-амплификации

Компоненты реакции	Объем (мкл)
10 мМ dNTP	0,40
25 5-кратный буфер Phusion HF	4,00
Высокоточная ДНК-полимераза Phusion Hot Start II (2 Ед/мкл) (Thermo Scientific)	0,25
Прямой праймер, 10 мкМ	0,40
Обратный праймер, 10 мкМ	0,40
Разведение 1:10000 красителя SYBR Green I (Invitrogen)	1,00
H ₂ O, степень очистки для молекулярной биологии	11,55
30 Геномная ДНК-матрица (~20 нг/мкл)	2,00
Общий объем	20,00

Растения, в которых имела место амплификация эндогенной мишени, не было амплификации мишени ZFN, оценивали как позитивные в teste нарушенного локуса и считали имеющими нарушенный локус ZFN. Такой анализ оценивали как позитивный, 35 когда сайт связывания ZFN в обоих аллелях в локусе FAD2A был нарушен.

ПЦР-ВЫЯВЛЕНИЕ ИНТЕГРАЦИИ ТРАНСГЕНА В FAD2A ПОСРЕДСТВОМ ЗАВИСИМОЙ ОТ ГОМОЛОГИИ РЕПАРАЦИИ

Каждый предполагаемый растительный трансформант анализировали, используя результат, полученный с использованием ПЦР-праймеров, сконструированных для 40 амплификации трансгенной мишени hph (hph_ExoDigPC_F1, SEQ ID NO: 457, 5'TTGCCTGACGGATTCTACAAGGA 3' и hph_ExoDigPC_R1, SEQ ID NO: 458, 5'TCCATCAGTCCAAACAGCAGCAGA 3'), эндогенного локуса FAD2A (FAD2A.Out.F1, SEQ ID NO: 459, 5' CATAGCAGTCTCACGTCTGGT*C 3' и FAD2A.Out.Rvs3, SEQ ID NO: 460, 5' GGAAGCTAACGCCATTACACTGTTCA*G 3'), области, охватывающей 5'-конец любого трансгена, встроенного в локус FAD2A посредством HDR, выше трансгена 45 в локусе FAD2 A (FAD2A.Out.F1, SEQ ID NO: 461, 5' CATAGCAGTCTCACGTCTGGT*C 3' и QA520, SEQ ID NO: 462, 5' CCTGATCCGTTGACCTGCAG 3'), и области, охватывающей 3'-конец любого трансгена, встроенного в локус FAD2A посредством

HDR, ниже трансгена в локусе FAD2 A locus (QA558, SEQ ID NO: 463, 5' GTGTGAGGTGGCTAGGCATC 3' и FAD2A.Out.Rvs3, SEQ ID NO: 464, 5' GGAAGCTAACGCCATTACACTGTTCA*G 3') (фиг.33). Все пары праймеров амплифицировали, используя следующие условия: 98°C в течение 30 секунд с 5 последующими 35 циклами (98°C в течение 10 секунд, 65°C в течение 20 секунд, 72°C в течение 90 секунд). Условия использования реагентов для реакции описаны в таблице 19.

Таблица 19 Реагирующие компоненты в одной реакции и концентрации для ПЦР-амплификации		
	Компоненты реакции	Объем (мкл)
10	5-кратный буфер Phusion HF	6,00
	10 мМ dNTP	0,60
	Прямой праймер, 10 мкМ	0,60
	Обратный праймер, 10 мкМ	0,60
15	Высокоточная ДНК-полимераза Phusion Hot Start II (2 Ед/мкл) (Thermo Scientific)	0,25
	H ₂ O, степень очистки для молекулярной биологии	19,95
	Геномная ДНК-матрица (~20 нг/мкл)	2,00
	Общий объем	30,0

Амплификация геномной 5'-фланкирующей трансген мишени и/или амплификация геномной 3'-фланкирующей трансген мишени показали предполагаемое событие инсерции. Необходимо отметить, что вследствие присутствия гомологичных плеч FAD2A длиной примерно 1000 п. н. в кассете pDAS000130 (содержащей полинуклеотидные последовательности со 100% идентичностью последовательности с областями FAD2A, расположенными непосредственно выше и ниже сайта разрезания ZFN), в реакционных смесях для ПЦР происходила ложноположительная амплификация продуктов ПЦР из-за химеризма ПЦР, возникающего в результате амплификации событий интеграции ETIP вне мишени. Амплификация мишени hph подтверждала тот факт, что происходила интеграция трансгена. Амплификация мишени FAD2A свидетельствует о том, что локус FAD2A является интактным или содержит только частичную инсерцию. Из-за размера ETIP (11462 п. н. для кассет ETIP или 13472 п. н., включая гомологичные плечи FAD2A и кассеты ETIP) ожидается, что праймеры FAD2A не могут амплифицировать продукт, когда интактная ETIP интегрирована в локус FAD2A.

ВЫЯВЛЕНИЕ РЕДАКТИРОВАНИЯ FAD2A В САУЗЕРН-АНАЛИЗЕ

Растения, которые либо имели амплификацию продукта геномной 5'-фланкирующей трансген мишени и/либо амплификацию 3' геномной фланкирующей трансген мишени, либо не имели амплификации локуса-мишени ZFN, или и то и другое, подвергали Саузерн-анализу для выявления интеграции трансгена в локус FAD2A. Геномную ДНК очищали из 5 г ткани листа, используя модифицированный СТАВ метод (Maguire, T.L., G.G. Collins, and M. Sedgley A modified CTAB DNA extraction procedure for plants belonging to the family proteaceae. Plant Molecular Biology Reporter, 1994. 12(2): p. 106-109). Затем 12 мкг геномной ДНК расщепляли, используя Kpn1-HF (New England BioLabs), и фрагменты расщепления разделяли электрофорезом в 0,8% агарозном геле перед переносом на мембрану с использованием стандартного протокола Саузерн-блоттинга. Праймеры к 5'-области мишени FAD2A (F, SEQ ID NO: 465, 5' AGAGAGGAGACAGAGAGAGT 3' и R, SEQ ID NO: 466, 5' AGACAGCATCAAGATTTCACACA 3'), 3'-области мишени FAD2A (F, SEQ ID NO: 467, 5' CAACGGCGAGCGTAATCTTAG 3' и R, SEQ ID NO: 468, 5' GTTCCCTGGAATTGCTGATAGG 3') и hph (F, SEQ ID NO: 469, 5' TGTTGGTGGAAAGAGGGATACG 3' и R, SEQ ID NO: 470, 5' ATCAGCAGCAGCGATAGC 3') использовали для создания зондов, чтобы выявить присутствие ETIP в локусе FAD2A

с использованием системы DIG EASY HYB SYSTEM® (Roche, South San Francisco, CA), следуя инструкциям производителя (фиг.34). Гибридизацию осуществляли при 42°C в случае 5'-области FAD2A, 45°C в случае 3'-области FAD2A и 42°C для выявления hph.

Связанную с мембранный геномной ДНК исследовали с использованием зондов в

- 5 конкретном порядке: сначала исследовали 5'-последовательности FAD2A, затем исследовали 3'-последовательности FAD2A и, наконец, исследовали последовательности hph (фиг.35). Обоснование такого исследования заключалось в следующем. Первый зонд (5'-FAD2A) является диагностическим зондом, и если ETIP была интегрирована в FAD2A посредством точной HDR, то фрагмент длиной 5321 п. н. будет видно на мемbrane. Получаемый в результате размер полосы легко отличить во время электропорации, и он будет находиться вблизи фрагментов длиной 5148 п. н. DIG-меченых маркеров молекулярной массы ДНК Roche III (Roche, Indianapolis, IN). Второе исследование мембранные осуществляют с использованием зонда 3'-FAD2A, и подвергнутое генетическому редактированию растение будет иметь фрагмент длиной 15 22433 п. н., тогда как не подвергнутое редактированию растение будет иметь фрагмент 16468 п. н.. Такой же фрагмент длиной 22433 п. н., идентифицированный с использованием зонда 3'-FAD2A, также должен связываться и может быть идентифицирован с использованием зонда hph. Такие фрагменты трудно отличить в геле, так как они являются чрезвычайно крупными, и может быть трудно определить 20 какое-либо различие между фрагментом, находящимся выше или ниже самого крупного фрагмент длиной 21226 п. н. среди DIG-меченых маркеров молекулярной массы ДНК Roche III®. Соответственно, такие зонды позволяют получать данные, которые могут подкрепить идентификацию интеграции ETIP в FAD2A посредством зависимой от гомологии репарации (HDR), за счет визуализации фрагмента длиной 5 т.п.н. с 25 использованием зонда 5' FAD2A. Фермент рестрикции, KpnI, был единственной подходящей эндонуклеазой рестрикции для применения в настоящем анализе, так как сайты KpnI находились в одном участке разрезания кассеты ETIP в одном локусе, и присутствовал в двух участках локуса ZNF FAD2A. Один участок располагался выше, а второй участок располагался ниже плеч гомологии FAD2A. Кроме того, KpnI не 30 чувствительна к метилированию и доступна в виде рекомбинантного фермента повышенной точности (New England Biolabs).

РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО И САУЗЕРН-АНАЛИЗА

После трансфекции, культивирования и отбора трансгенные растения переносили в почву. В результате такого процесса выжили 139 растений, и из них брали образцы

- 35 тканей для экстракции гДНК и анализа. Все 139 растений анализировали для оценки количества копий. Из указанных 139 растений 56 были позитивными в отношении ETIP, и 11 из 56 позитивных растений имели предполагаемую интеграцию одной копии (фиг.36) (таблица 20). Из 56 растений, которые были позитивными в отношении интеграции ETIP, амплификация геномной 5'фланкирующей трансген последовательности FAD2A 40 происходила в 7 растениях. Амплификация геномной 3'-фланкирующей трансген последовательности FAD2A не происходила ни в одном из 56 растений, которые были позитивными в отношении интеграции ETIP. Кроме того, из 56 растений, которые были позитивными в отношении интеграции трансгена, 11 растений были позитивными в кПЦР-тесте нарушенного локуса. Четырнадцать растений, которые были позитивными 45 в отношении амплификации геномной 5'-фланкирующей трансген последовательности FAD2A и/или позитивными в кПЦР-тесте нарушенного локуса, подвергали Саузерн-анализу с использованием 3 зондов, описанных выше. Из 14 растений, выбранных для Саузерн-анализа, во всех растениях наблюдали частичную интеграцию в локус FAD2A,

но ни в одном из таких растений не наблюдали свидетельств полной интеграции полноразмерной ETIP в локус FAD2A посредством HDR при исследовании с использованием зонда 5' FAD2A, зондов 3' FAD2A и hph. Нет полос, которые выглядели i) крупнее WT и ii) идентичными полосам, наблюдавшимся в случае таких образцов при исследовании с использованием зонда 3' FAD2A (таблица 20).

Таблица 20

Краткое описание результатов анализа интеграции ETIP

10	Количество растений, выживших на почве	Количество растений, из которых взяты образцы	Количество растений, для которых был осуществлен кПЦР-анализ количества копий	Количество растений, позитивных в отношении интеграции ETIP	Количество растений, содержащих предполагаемую однокопийную вставку	Количество ETIP/5'-реакция «in-out» FAD2	Количество ETIP/3'-реакция «in-out» FAD2	Количество нарушенных локуса в кПЦР-тестах	ETIP в мишени (Саузерн)
	139	139	139	56	11	7 (из 56)	0 (из 56)	9 (из 56)	0 (из 14)

РЕЗУЛЬТАТЫ ДЛЯ ТРАНСГЕННОЙ ПО ЕТИР КАНОЛЫ, 15 ТРАНСФОРМИРОВАННОЙ PDAS000130 и PDAB104010

Трансгенные события *Brassica napus*, которые получали в результате трансформации pDAS000130 и pDAB104010, приводят к интеграции однокопийной полноразмерной вставки Т-нити полинуклеотидной последовательности ETIP из pDAS000130 в локус FAD2A. Три-четыре события полностью характеризовали и подтвердили, что они содержат интегрированную ETIP. Подтверждение осуществляли, используя способ ПЦР-амплификации «внутри - за пределами» (in-out), и дополнительно подтверждали, используя Саузерн-блот. Отобранные растения T₀, в которых произошли такие события, выращивали до стадии развития T₁. Растения T₁ подвергали повторному скринингу, чтобы определить зиготность интегрированной Т-нити. Подвергнутые скринингу события классифицировали как гомозиготные, гемизиготные или нулевые.

Гомозиготные события использовали для получения протопластов с применением описанного ранее способа. Затем протопласти котрансфицировали нуклеазой с цинковым пальцем, которая предназначена для целенаправленного воздействия на сайт связывания цинкового пальца, который включен в последовательность ETIP и донорную плазмиду, которая обладает гомологией с конкретными областями ETIP, при этом донорная плазмида интегрируется в ETIP посредством механизма HDR. Затем подобным образом протопласти котрансформировали нуклеазой с цинковым пальцем, которая предназначена для целенаправленного воздействия на сайт связывания цинкового пальца, который включен в последовательность ETIP и донорную плазмиду, которая не обладает гомологией с конкретными областями ETIP, при этом донор интегрируется в ETIP посредством механизма связывания негомологичных концов. Нуклеаза с цинковым пальцем расщепляет локус ETIP, и донорная плазмида интегрируется в геном клеток *Brassica napus* посредством зависимой от гомологии репарации или связывания негомологичных концов. В результате интеграции донорной плазмиды неполный трансген DS-red репарируется до полноразмерного трансгена DS-red. После этого экспрессию полностью функционального трансгена DS-red используют для сортировки протопластов клеток способом FACS. Предполагаемые трансгенные растения отсортируют, используя способ FACS, описанный в примере 7, и изолированные протопласти регенерируют в зрелые растения. Интеграцию донорной плазмиды подтверждают в растениях с целенаправленно введенной ETIP, используя молекулярные способы подтверждения. Соответственно, локус ETIP служит в качестве сайт-специфичного локуса для целенаправленной интеграции гена из донорной

полинуклеотидной последовательности.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ДЛЯ ТРАНСГЕННОЙ ПО ЕТИР КАНОЛЫ,
ТРАНСФОРМИРОВАННОЙ НУКЛЕАЗОЙ С ЦИНКОВЫМ ПАЛЬЦЕМ И ЕТИР-
КОНСТРУКЦИЯМИ PDAS000271-PDAS000275**

- 5 Трансгенные события *Brassica napus*, которые получали в результате трансформации конструкциями ETIP и нуклеазы с цинковым пальцем, приводят к интеграции однокопийной полноразмерной вставки T-нити полинуклеотидной последовательности ETIP из pDAS000273 или pDAS275 в локус FAD2A и из pDAS000271, pDAS000272 или pDAS000274 в локус FAD3C. Три-четыре события полностью характеризовали и
- 10 подтвердили, что они содержат интегрированную ETIP. Подтверждение осуществляли, используя способ ПЦР-амплификации «in-out», и дополнительно подтверждали, используя Саузерн-блот. Отобранные растения T_0 , в которых произошли такие события, выращивали до стадии развития T_1 . Растения T_1 подвергали повторному скринингу, чтобы определить зиготность интегрированной T-нити. Подвергнутые скринингу 15 события классифицировали как гомозиготные, гемизиготные или нулевые.

Гомозиготные события использовали для получения протопластов с применением описанного ранее способа. Затем протопласти котрансфицировали нуклеазой с цинковым пальцем, которая предназначена для целенаправленного воздействия на сайт связывания цинкового пальца, который включен в последовательность ETIP и донорную плазмиду, которая обладает гомологией с конкретными областями ETIP. Нуклеаза с цинковым пальцем расщепляет локус ETIP, и донорная плазмиды интегрируется в геном клеток *Brassica napus* посредством зависимой от гомологии репарации. В результате интеграции донорной плазмиды неполный трансген DS-red 20 репарируется до полноразмерного трансгена DS-red. После этого экспрессию полностью функционального трансгена DS-red используют для сортировки протопластов клеток способом FACS. Предполагаемые трансгенные растения отсортируют, используя способ FACS, описанный в примере 7, и изолированные протопласти регенерируют в зрелые растения. Интеграцию донорной плазмиды подтверждают в растениях с 25 целенаправленно введенной ETIP, используя молекулярные способы подтверждения. Соответственно, локус ETIP служит в качестве сайт-специфичного локуса для 30 целенаправленной интеграции гена из донорной полинуклеотидной последовательности.

ПРИМЕР 7: ОСНОВАННАЯ НА FACS СОРТИРОВКА КЛЕТОЧНЫХ ПРОТОПЛАСТОВ

35 Протопласти *Brassica napus*, которые были трансфицированы контрольной конструкцией DS-Red, pDAS000031, подвергали сортировке с применением опосредованной FACS сортировки клеток, используя сортировщик BD Biosciences Influx-Cell (San Jose, CA). Клеточные протопласти выделяли и трансфицировали, как описано в примере 3. После того, как клетки были трансфицированы pDAS000031, клетки 40 отсортировывали, используя FACS-сортировщик, в условиях, описанных в таблице 21.

Таблица 21 Условия, используемые для сортировки клеточных протопластов, трансформированных pDAS000031	
Параметры	
Частота капель	6,1 кГц
Диаметр сопла	200 мкм
Обжимающее давление	4 фунта/кв. дюйм (27,5 кПа)
Среда для извлечения	Среда W5
Условия культивирования	Культура шарикового типа с использованием легкоплавкой агарозы и альгината натрия

Критерии сортировки	Сортировка на основе автофлуоресценции хлорофилла, экспрессии репортерного гена (Ds-Red)
Выход сортировки (%)	50-75
Жизнеспособность после сортировки (%)	>95

5 Протопласти, которые экспрессировали трансген DS-red, отсортировывали и выделяли. Выделенные в ходе FACS протопласти подсчитывали, используя сортировщик. Примерно от 1×10^5 до $1,8 \times 10^5$ клеток помещали в лунку 24-луночного планшета для микротитрования в первый день после FACS-выделения. Клетки переносили в культуру на шариках на 5-20 дней. Тестировали сходные условия, когда 10 примерно 1×10^4 клеток помещали в лунку 2 или 4-луночного планшета для микротитрования на второй день после FACS-выделения. Различные условия, которые были тестированы, приводили к извлечению клеток с жизнеспособностью 95-98% от общего количества выделенных клеточных протопластов. Отсортированные в FACS клеточные протопласти переносили в культуру на шариках на 3-20 дней.

15 Отсортированные с использованием FACS клеточные протопласти регенерировали в растения на среде, которая содержала 1,5 мг/мл гигромицина, используя описанный выше протокол. Подтверждали, что предполагаемые трансгенные растения содержат вставку интактной T-нити из pDAS000031, используя протоколы молекулярного подтверждения.

20 ТАРГЕТИНГ ЕТИР-ЛИНИЙ ПОСРЕДСТВОМ ОПОСРЕДОВАННОЙ ZFN ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ DS-RED

Получали линию канолы, содержащую вставку T-нити из pDAS000036, и подтверждали, используя молекулярную характеристику, что она содержит полноразмерную однокопийную T-нить. Такое событие канолы обозначали pDAS000036-25 88 и использовали для получения протопластов ранее описанным способом. Выделяли протопласти и затем ~50000 протопластов клеток канолы трансформировали нуклеазой с цинковым пальцем, либо pDAS000074 (фиг.25), либо pDAS000075 (фиг.26), которая была предназначена для целенаправленного воздействия на сайты связывания цинкового пальца, включенные в последовательность ETIP и донорную плазмиду, pDAS000064, 30 pDAS000068, pDAS000070 или pDAS000072 (фиг.27, фиг. 28, фиг. 29 и фиг. 30, соответственно), которая обладала гомологией с конкретными областями ETIP. На фиг. 19 и фиг. 20 представлены иллюстрации зависимой от гомологии reparации, которая приводит к сайт-специфичной интеграции трансгена Ds-red посредством опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем гомологичной рекомбинации. Нуклеаза с цинковым 35 пальцем была предназначена для расщепления локуса ETIP в определенной последовательности, связывающей цинковый палец и тем самым создания двунитевого разрыва в геноме. Затем донорная плазмида интегрировалась в геном клеточных протопластов Brassica napus посредством зависимой от гомологии reparации. Области интрона-1 и интрона-2 донорной плазмиды имеют гомологию с соответствующим 40 областями интрона-1 и интрона-2 локуса ETIP. В результате интеграции донорной плазмиды неполный трансген DS-red репарируется до полноразмерного в высокой степени экспрессирующегося трансгена DS-red. Экспрессию полностью функционального трансгена DS-red использовали для сортировки клеточных протопластов описанным выше способом FACS. Соответственно, локус ETIP служит в качестве сайт-специфичного 45 локуса для целенаправленной интеграции в ген донорной полинуклеотидной последовательности. Наконец, изолированные протопласти могут быть отсортированы и регенерированы в зрелые растения. Интеграция донорной плазмиды может быть подтверждена в растениях с целенаправленной введенной ETIP с использованием

способов молекулярного подтверждения.

ДНК донорной плазмида и ДНК ZFN-плазмида смешивали в различных концентрациях и использовали для трансфекции клеточных протопластов канолы, содержащих событие pDAS000036 - 88, и трансгенные клеточные протопласти

5 сортировали, используя FACS-сортировку, которая описана ранее. Таблица 22 описывает различные эксперименты по трансфекции и концентрации ДНК, которые были использованы для трансфекции протопластов канолы, содержащих событие pDAS000036-88. ДНК ZFN и донорной плазмида выделяли и готовили для трансфекций ранее описанными способами.

10

Таблица 22

Донорные плазмиды и конструкции нуклеаз с цинковыми пальцами, используемые для экспериментов по целенаправленному введению ETIP. Концентрации ДНК использовали в указанном соотношении донора и нуклеазы с цинковым пальцем при общей концентрации 30 микрограммов плазмидной ДНК на трансфекцию

Реакции	Плазмиды	ДНК донорной плазмида (мкг)	ДНК ZFN-плазмида (мкг)	Всего (мкг)
1	pDAS000074	-	30	30
2	pDAS000075	-	30	30
3	pDAS000064 + pDAS000074	26	4	30
4	pDAS000064 + pDAS000075	26	4	30
5	pDAS000068 + pDAS000074	28	2	30
6	pDAS000068 + pDAS000075	28	2	30
7	pDAS000070 + pDAS000074	28	2	30
8	pDAS000070 + pDAS000075	28	2	30
9	pDAS000072 + pDAS000074	28	2	30
10	pDAS000072 + pDAS000075	28	2	30
11	pDAS000064	30	-	30
12	pDAS000068	30	-	30
13	pDAS000070	30	-	30
14	pDAS000072	30	-	30

15

20

25

После завершения экспериментов по трансфекции протопласти инкубировали при комнатной температуре в течение 48 часов и сортировали, используя описанный выше протокол FACS. Каждый эксперимент по сортировке проводили независимо, и

30

опосредованную цинковыми пальцами интеграцию трансгена подтверждали, идентифицируя отдельные события, при которых экспрессировался трансген Ds-red. На фиг. 21-24 показаны результаты FACS-сортировки. Как показывают результаты, приведенные на графиках, были получены множественные события, которые содержали

35

интактный полностью интегрированный трансген Ds-red. Такие множественные события Ds-Red были результатом опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP. Такая сайт-специфичная интеграция приводила к появлению в высокой степени экспрессирующейся полной копии трансгена Ds-Red. Частота экспрессии трансгена Ds-Red была в диапазоне примерно 0,03-0,07% от общего количества протопластов клеток канолы (~50000). Однако частота

40

эффективной трансфекции для опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP была намного больше, в диапазоне примерно 0,07-0,64%.

45

На фиг. 21 показаны результаты трансфекций, при которых осуществляли котрансформацию донорной плазмида и ZFN-плазмида. На верхнем графике показан случай, когда донор, pDAS000064, и нуклеазу с цинковым пальцем, pDAS000074, котрансформировали в соотношении 26 мкг к 4 мкг плазмидной ДНК с получением опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP с частотой рекомбинации примерно 0,03% от количества

протопластов клеток канолы, составляющего ~50000. В действительности, частота рекомбинации была намного выше. Из ~50000 протопластов клеток канолы, которые были использованы в эксперименте по трансфекции, только примерно 10-30% таких протопластов клеток канолы были действительно трансформированы. Соответственно, 5 фактическая эффективность трансфекции в результате опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP находится в диапазоне примерно 0,22-0,07%. Подобным образом, на нижнем графике показан случай, когда донор, pDAS000064, и нуклеазу с цинковым пальцем, pDAS000075, котрансфицировали в соотношении 26 мкг к 4 мкг плазмидной ДНК с получением 10 опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP с частотой рекомбинации примерно 0,03% от количества протопластов клеток канолы, составляющего ~50000. В действительности, частота рекомбинации была намного выше. Из ~50000 протопластов клеток канолы, которые были использованы в эксперименте по трансфекции, только примерно 10-30% таких 15 клеток были действительно трансфицированы. Соответственно, фактическая эффективность трансфекции в результате опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP находится в диапазоне примерно 0,26-0,08%. Результаты опосредованной цинковым пальцем зависимой от гомологии репарации значимо превышают негативные контрольные 20 эксперименты, когда идентифицировали только один протопласт из ~50000, который давал красную флуоресценцию, что в результате соответствует частоте рекомбинации 0,00%, как показано на фиг. 20.

На фиг. 22 показаны результаты трансфекций, при которых осуществляли котрансформацию донорной плазмиды и ZFN-плазмиды. На верхнем графике показан 25 случай, когда донор, pDAS000068, и нуклеазу с цинковым пальцем, pDAS000074, котрансфицировали в соотношении 28 мкг к 2 мкг плазмидной ДНК с получением опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP с частотой рекомбинации примерно 0,03% от количества протопластов клеток канолы, составляющего ~50000. В действительности, частота 30 рекомбинации была намного выше. Из ~50000 протопластов клеток канолы, которые были использованы в эксперименте по трансфекции, только примерно 10-30% таких протопластов клеток канолы были действительно трансформированы. Соответственно, фактическая эффективность трансфекции в результате опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP 35 находится в диапазоне примерно 0,22-0,07%. Подобным образом, на нижнем графике показан случай, когда донор, pDAS000068, и нуклеазу с цинковым пальцем, pDAS000075, котрансфицировали в соотношении 28 мкг к 2 мкг плазмидной ДНК с получением опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP с частотой рекомбинации примерно 0,04% от количества 40 протопластов клеток канолы, составляющего ~50000. В действительности, частота рекомбинации была намного выше. Из ~50000 протопластов клеток канолы, которые были использованы в эксперименте по трансфекции, только примерно 10-30% таких клеток были действительно трансфицированы. Соответственно, фактическая эффективность трансфекции в результате опосредованной нуклеазой с цинковым 45 пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP находится в диапазоне примерно 0,38-0,12%. Результаты опосредованной цинковым пальцем зависимой от гомологии репарации значимо превышают негативные контрольные эксперименты, когда идентифицировали только один протопласт из ~50000, который

давал красную флуоресценцию, что в результате соответствует частоте рекомбинации 0,00%, как показано на фиг. 20.

На фиг. 23 показаны результаты трансфекций, при которых осуществляли котрансформацию донорной плазмиды и ZFN-плазмиды. На верхнем графике показан случай, когда донор, pDAS000070, и нуклеазу с цинковым пальцем, pDAS000074, котрансфицировали в соотношении 28 мкг к 2 мкг плазмидной ДНК с получением опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP с частотой рекомбинации примерно 0,07% от количества протопластов клеток канолы, составляющего ~50000. В действительности, частота рекомбинации была намного выше. Из ~50000 протопластов клеток канолы, которые были использованы в эксперименте по трансфекции, только примерно 10-30% таких протопластов клеток канолы были действительно трансформированы. Соответственно, фактическая эффективность трансфекции в результате опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP находится в диапазоне примерно 0,64-0,21%. Подобным образом, на нижнем графике показан случай, когда донор, pDAS000070, и нуклеазу с цинковым пальцем, pDAS000075, котрансфицировали в соотношении 28 мкг к 2 мкг плазмидной ДНК с получением опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP с частотой рекомбинации примерно 0,04% от количества протопластов клеток канолы, составляющего ~50000. В действительности, частота рекомбинации была намного выше. Из ~50000 протопластов клеток канолы, которые были использованы в эксперименте по трансфекции, только примерно 10-30% таких клеток были действительно трансфицированы. Соответственно, фактическая эффективность трансфекции в результате опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP находится в диапазоне примерно 0,34-0,11%. Результаты опосредованной цинковым пальцем зависимой от гомологии репарации значимо превышают негативные контрольные эксперименты, когда идентифицировали только один протопласт из ~50000, который давал красную флуоресценцию, что в результате соответствует частоте рекомбинации 0,00%, как показано на фиг. 20.

На фиг. 24 показаны результаты трансфекций, при которых осуществляли котрансформацию донорной плазмиды и ZFN-плазмиды. На верхнем графике показан случай, когда донор, pDAS000072, и нуклеазу с цинковым пальцем, pDAS000074, котрансфицировали в соотношении 28 мкг к 2 мкг плазмидной ДНК с получением опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP с частотой рекомбинации примерно 0,07% от количества протопластов клеток канолы, составляющего ~50000. В действительности, частота рекомбинации была намного выше. Из ~50000 протопластов клеток канолы, которые были использованы в эксперименте по трансфекции, только примерно 10-30% таких протопластов клеток канолы были действительно трансформированы. Соответственно, фактическая эффективность трансфекции в результате опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP находится в диапазоне примерно 0,62-0,20%. Подобным образом, на нижнем графике показан случай, когда донор, pDAS000072, и нуклеазу с цинковым пальцем, pDAS000075, котрансфицировали в соотношении 28 мкг к 2 мкг плазмидной ДНК с получением опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP с частотой рекомбинации примерно 0,05% от количества протопластов клеток канолы, составляющего ~50000. В действительности, частота

рекомбинации была намного выше. Из ~50000 протопластов клеток канолы, которые были использованы в эксперименте по трансфекции, только примерно 10-30% таких клеток были действительно трансфицированы. Соответственно, фактическая эффективность трансфекции в результате опосредованной нуклеазой с цинковым пальцем интеграции конструкции донорной ДНК в геномный локус ETIP находится в диапазоне примерно 0,44-0,14%. Результаты опосредованной цинковым пальцем зависимой от гомологии репарации значимо превышают негативные контрольные эксперименты, когда идентифицировали только один протопласт из ~50000, который давал красную флуоресценцию, что в результате соответствует частоте рекомбинации 0,00%, как показано на фиг. 20.

Отобранные эксплантаты переносили и культивировали в среде для регенерации, содержащей фосфинотрицин. После периода культивирования выжившие эксплантаты переносили на среду для роста в длину и среду для индукции корней с целью культивирования и развития растений. Целые растения, которые состояли из развитых структур корня и побега, переносили в почву и затем выращивали в теплице. В процессе культивирования тканей использовали среды и условия культивирования, которые описаны выше. Результаты получения растений способом культивирования тканей показаны в таблице 23 ниже.

Таблица 23
Результаты, полученные способом культивирования тканей

Конструкция	Количество экспланта- тов, перенесенных на среду для регенера- ции: B2-2 PPT	Количество экспланта- тов, выживших на сре- де для регенерации: B2-2 PPT	Количество побегов, вы- живших на среде для удлинения побегов: SEM- 2 PPT	Количество побе- гов, выживших в RIM-2 PPT	Количество расте- ний с корнями, пере- несенных в почву
pDAS000064+ pDAS000074-I	4021	36	74	1	--
pDAS000064+ pDAS000074-II	1300	90	13	1	1
pDAS000064+ pDAS000074-III	1760	15	36	2	--
pDAS000068+ pDAS000074-I	1700	100	4	8	2
pDAS000068+ pDAS000074-II	1630	--	29	15	--
pDAS000068+ pDAS000074-III	2523	30	11	1	--
pDAS000070+ pDAS000074-I	2084	10	34	1	--
pDAS000070+ pDAS000074-II	4151	--	88	7	--
pDAS000070+ pDAS000074-III	1480	415	14	0	--
pDAS000072+ pDAS000074-I	1980	7	19	16	--
pDAS000072+ pDAS000074-II	1050	0	0	0	--
pDAS000072+ pDAS000074-III	1200	--	2	0	--
pDAS000064+ pDAS000074-I	556	--	8	1	--
pDAS000064+ pDAS000074-II	581	13	7	--	--
pDAS000064+ pDAS000074-III	1160	90	17	1	--
pDAS000068+ pDAS000074-I	516	0	13	--	--
pDAS000068+ pDAS000074-II	1725	55	19	3	--
pDAS000068+ pDAS000074-III	930	57	0	--	--

5	pDAS000070+ pDAS000074-I	600	8	3	--	--
	pDAS000070+ pDAS000074-II	4410	1410	360	3	--
	pDAS000070+ pDAS000074-III	2350	108	51	8	--
	pDAS000072+ pDAS000074-I	1660	10	19	3	1
	pDAS000072+ pDAS000074-II	175	--	13	--	--
	pDAS000072+ pDAS000074-III	250	9	2	--	--

10	Конструкции	Количество извлеченных протопластов	Количество экс-плантатов, перенесенных на среду для регенерации: B2-2 РРТ	Количество экс-плантатов, выживших на среде для регенерации: B2-2 РРТ	Количество извлеченных побегов на среде для удлинения побегов: SEM-2-2 РРТ	Количество побегов, перенесенных в RIM-2 РРТ	Количество растений с корнями, перенесенных в почву
			--	--	--	--	--
15	pdAS000064 + pdAS000074	3×10^5	--	--	--	--	--
pdAS000068 + pdAS000074	1×10^5	114	12	1	--	--	--
pdAS000070 + pdAS000074	3×10^5	478	391	--	--	--	--
pdAS000072 + pdAS000074	3×10^5	81	12	--	--	--	--
pdAS000064 + pdAS000074	3×10^5	38	7	--	--	--	--
pdAS000068 + pdAS000074	3×10^5	--	--	--	--	--	--
pdAS000070 + pdAS000074	1×10^5	80	7	1	--	--	--
pdAS000072 + pdAS000074	3×10^5	7	3	--	--	--	--

25 Способ FACS-сортировки непосредственно применим для скрининга любой флуоресцирующей последовательности трансгена и используется для выделения части каких-либо протопластов, в данном случае протопластов клеток *Brassica napus*, в которые целенаправленно введен флуоресцирующий трансген посредством зависимой от гомологии reparации в конкретный сайт в области ETIP в геномном локусе.

30 Хотя в настоящем описании были раскрыты некоторые примеры вариантов осуществления изобретения, специалистам данной области будет понятно и учтено, что могут быть сделаны добавления, исключения и модификации приведенных в качестве примеров вариантов, не выходя за рамки объема следующей далее формулы изобретения. Кроме того, признаки одного варианта могут быть объединены с признаками другого 35 варианта.

(57) Формула изобретения

1. Способ получения растения из популяции растительных клеток, включающий выделение протопласта растения, содержащего представляющий интерес полинуклеотид, 40 при этом способ включает:

обеспечение популяции растительных протопластов, содержащей по меньшей мере один протопласт, который содержит представляющий интерес полинуклеотид, нуклеазу с цинковым пальцем (ZNF) и флуоресцирующий маркер, при этом популяция по существу не содержит растительных протопластов, содержащих флуоресцентный маркер и не 45 содержит представляющий интерес полинуклеотид; при этом растительный протопласт инкапсулируют в альгинат натрия;

отделение по меньшей мере одного протопласта, содержащего представляющий интерес полинуклеотид и флуоресцирующий маркер, от остальных растительных

протопластов в популяции с применением активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS) и, таким образом, выделение растительного протопласта, содержащего представляющий интерес полинуклеотид;

регенерацию растения из указанного выделенного растительного протопласта; и

⁵ культивирование указанного растения.

2. Способ по п.1, в котором флуоресцирующим маркером является флуоресцирующий полипептид, который экспрессируется с полинуклеотида в протопласте растения.

3. Способ по п.1, в котором популяция растительных протопластов получена из ткани растения.

¹⁰ 4. Способ по п.1, в котором растение является однодольным или двудольным растением.

5. Способ по п.4, в котором представляющий интерес полинуклеотид и полинуклеотид, кодирующий флуоресцирующий маркер, присутствуют в молекуле нукleinовой кислоты, используемой для трансформации по меньшей мере одного ¹⁵ протопласта, содержащего представляющий интерес полинуклеотид и флуоресцирующий маркер.

6. Способ по п.4, в котором представляющий интерес полинуклеотид и полинуклеотид, кодирующий флуоресцирующий маркер, интегрированы в геном по меньшей мере одного протопласта, содержащего представляющий интерес

²⁰ полинуклеотид и флуоресцирующий маркер.

7. Способ по п.6, в котором представляющий интерес полинуклеотид и полинуклеотид, кодирующий флуоресцирующий маркер, интегрированы сайт-специфичным образом в геном по меньшей мере одного протопласта.

²⁵ 8. Способ по п.7, в котором представляющий интерес полинуклеотид и полинуклеотид, кодирующий флуоресцирующий маркер, интегрированы сайт-специфичным образом при использовании нуклеазы с цинковым пальцем.

9. Способ получения трансгенного растения, при этом способ включает: обеспечение популяции растительных протопластов, содержащей по меньшей мере один протопласт, который содержит представляющий интерес полинуклеотид и ³⁰ флуоресцирующий маркер, при этом по меньшей мере один протопласт содержит нуклеазу с цинковым пальцем, так что представляющий интерес полинуклеотид способен подвергаться интеграции в геном по меньшей мере одного растительного протопласта за счет гомологичной рекомбинации в сайте распознавания нуклеазой с цинковым пальцем, и при этом растительный протопласт инкапсулируют в альгинат натрия;

³⁵ 30 отделение по меньшей мере одного протопласта, содержащего представляющий интерес полинуклеотид и флуоресцирующий маркер, от остальных растительных протопластов в популяции с применением активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS);

регенерацию трансгенного растения по меньшей мере из одного протопласта; и

⁴⁰ 40 культивирование указанного трансгенного растения.

523437

1/80

ФИГ. 1А	1	40
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(1) ATGGGTGCAGGTGGAAGAATGCAAGTGTCTCCTCCCTCCA	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(1) ATGGGTGCAGGTGGAAGAATGCAAGTGTCTCCTCCCTCCA	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(1) ATGGGCAGGTGGAAGAATGCAAGTGTCTCCTCCCTCCA	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(1) ATGGGTGCAGGTGGAAGAATGCAAGTGTCTCCTCCCTCCA	
	41	80
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(41) AGAA <u>GTC</u> TGAACCGACACC <u>ATCAAGCGCGTACCC</u> TGCGA	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(41) AAA <u>GTC</u> TGAACCGACACC <u>ATCAAGCGCGTACCC</u> TGCGA	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(41) G <u>CTCCCCCGAACCAAACCC</u> CTCAA <u>ACGGTCCC</u> CTGCGA	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(41) G <u>CTCCCCCGAACCAAACCC</u> CTCAA <u>ACGGTCCC</u> CTGCGA	
	81	120
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(81) GACACC <u>GGCC</u> TTCACT <u>GTC</u> GGAGAA <u>CTCAAGAAAGCAATC</u>	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(81) GACACC <u>GGCC</u> TTCACT <u>GTC</u> GGAGAA <u>CTCAAGAAAGCAATC</u>	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(81) GACACC <u>GGCC</u> TTCACT <u>GTC</u> GGAGAC <u>CTCAAGAAAGCAATC</u>	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(81) GACACC <u>GGCC</u> TTCACT <u>GTC</u> GGAGAC <u>CTCAAGAAAGCAATC</u>	
	121	160
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(121) CCAC <u>CGCA</u> CT <u>GTT</u> CAA <u>ACGCTCGATCC</u> CTGCT <u>CTT</u> TCT	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(121) CCAC <u>CGCA</u> CT <u>GTT</u> CAA <u>ACGCTCGATCC</u> CTGCT <u>CTT</u> TCT	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(121) CCAC <u>CGCA</u> CT <u>GTT</u> CAA <u>ACGCTCCATCC</u> CTGCT <u>CC</u> TTCT	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(121) CCAC <u>CGCA</u> CT <u>GTT</u> CAA <u>ACGCTCCATCC</u> ACGCT <u>CC</u> TTCT	
	161	200
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(161) CCTAC <u>CTCATCTGGGACAT</u> -- <u>CATCATAGCCTCC</u> TGCTTC	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(161) CCTAC <u>CTCATCTGGGACAT</u> -- <u>CATCATAGCCTCC</u> TGCTTC	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(161) CCTAC <u>CTCTCTTGACAT</u> -- <u>CCTCGTCTCC</u> CTCCCTCC	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(161) CCT-- <u>CTTGACATCATCTC</u> CT <u>GGCTCC</u> CTCC	
	201	240
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(199) TACTAC <u>GTCGCCACCA</u> CTTACT <u>TCCTCTCC</u> CTCACC	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(199) TACTAC <u>GTCGCCACCA</u> CTTACT <u>TCCTCTCC</u> CTCACC	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(199) TACCAC <u>CTCCACAGC</u> CTACT <u>TCCTCTCC</u> CCCCACC	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(200) TACCAC <u>CTCCACAGC</u> CTACT <u>TCCTCTCC</u> -----	

ФИГ.1А

2/80

ФИГ.1В	241	280
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(239) CTCTCTCTACTTCGCCCTGGCCTCTCTACTGGGCTGCCA	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(239) CTCTCTCTACTTCGCCCTGGCCTCTCTACTGGGCTGCCA	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(239) CTCTCCCTTACCTCGCCCTGGCCCCTCTACTGGGCTGCCA	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(231) -----CTTACCTCGCCCTGACCCCTCTACTGGGCTGCCA	
	281	320
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(279) AGGGTGCGTCCTAACCGGCGTCTGGGTATAGCCCACGAG	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(279) GGGCTGCGTCCTAACCGGCGTCTGGGTATAGCCCACGAG	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(279) AGGCTGCGTCCTAACGGGCCTCTGGGTATCGCCCACGAA	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(265) AGGCTGCGTCCTAACGGGCCTCTGGGTATAGCCCACGAG	
	321	360
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(319) TGCAGGCCACCACGCCCTCAGCGACTACCAGTGGCTTGACG	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(319) TGCAGGCCACCACGCCCTCAGCGACTACCAGTGGCTGGACG	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(319) TGCAGGCCACCACGCCCTCAGCGACCACCAGTGGCTGGACG	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(305) TGCAGGCCACCACGCCCTCAGCGACCACCAGTGGCTGGACG	
	361	400
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(359) ACACCGTCCGTCTCATTTCACTCCTTCCCTCGTCCC	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(359) ACACCGTCCGTCTCATTTCACTCCTTCCCTCGTCCC	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(359) ACGCCGTGGCCTCGTCTTCACTCCTTCCCTCGTCCC	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(345) ACGCCCGCCGGCCTCGTCTTCACTCCTTCCCTCGTCCC	
	401	440
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(399) TTACTTCTCCTGGAAGTACAGTCATCGACGCCACCATTC	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(399) TTACTTCTCCTGGAAGTACAGTCATCGACGCCACCATTC	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(399) TTACTTCTCCTGGAAGTACAGCCATCGACGCCACCATTC	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(385) GTACTTCTCCTGGAAGTACATCCAT-GACGCCACCATTC	
	441	480
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(439) AACACTGGCTCCCTCGAGAGAGACGAAGTGTGGTCCCCA	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(439) AACACTGGCTCCCTCGAGAGAGACGAAGTGTGGTCCCCA	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(439) AACACCGGATCCCTCGAGAGGGATGAAGTGTTCGTCCCCA	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(424) AACACCGGATCCCTCGATAAGGGACGAAGTGTGGTCCCCA	

ФИГ.1В

3/80

ФИГ.1С	481	520
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(479) AGAAGAAAGTCAGACATCAAGTGGTACGGCAAGTACCTCAA	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(479) AGAAGAAAGTCAGACATCAAGTGGTACGGCAAGTACCTCAA	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(479) AGAAGAAATCCGACATCAAGTGGTACGGAAAGTACCTCAA	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(464) AGAAGAAATCCGACATCAAGTGGTACGGCAAGTACCTCAA	
	521	560
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(519) CAACCCTTTGGGACGCACCGTGTGATGTTAACGGTCAGTT	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(519) CAACCCTTTGGGACGCACCGTGTGATGTTAACGGTCAGTT	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(519) CAACCCGCTAGGACGCACGGTGATGCTAACCGTCCAGTT	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(504) CAACCCGCTAGGACGCACGGTGATGCTAACCGTCCAGTT	
	561	600
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(559) ACTCTCGGCTGGCCGTGTACTTAGCCTTCAACGTCTCGG	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(559) ACTCTCGGCTGGCCTTTGTACTTAGCCTTCAACGTCTCGG	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(559) ACGCTCGGCTGGCCGTGTACTTAGCCTTCAACGTCTCGG	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(544) AAGCTCGGCTGGCCGTGTACTTAGCCTTCAACGTCTCGG	
	601	640
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(599) GAAGACCTTACGACGGCGGCTTCGCTTGCCATTCCACCC	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(599) GGAGACCTTACGACGGCGGCTTCGCTTGCCATTCCACCC	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(599) GAAGACCTTACAGCGACGGTTCGCTTGCCATTCCACCC	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(584) GAAGACCTTACAGCGACGGTTCGCTTGCCATTCCACCC	
	641	680
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(639) CAACGCTCCCCTACAACGACCGCGAGCGTCTCCAGATA	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(639) CAACGCTCCCCTACAACGACCGTGAGCGTCTCCAGATA	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(639) GAACGCTCCCCTACAACGACCGCGAGCGTCTCCAGATA	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(624) GAACGCTCCCCTACAACGACCGCGAGCGTCTCCAGATA	
	681	720
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(679) TACATCTCCGACGCTGGCATCCTCGCCGTCTGCTACGGTC	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(679) TACATCTCCGACGCTGGCATCCTCGCCGTCTGCTACGGTC	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(679) TACATCTCTGACGCTGGCGTCCTCTCCGTATGTTACGGTC	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(664) TACATCTCTGACGCTGGCGTCCTCTCCGTATGTTACGGTC	

ФИГ.1С

ФИГ.1Д	721	760
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(719) TCTTCCGTTACGCCGCCGCCAGGGAGTGGCCTCGATGGT	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(719) TCTACCGCTACGCTGCTGTCCAAGGAGTTGCCTCGATGGT	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(719) TCTACCGCTACGCTGGTTCGGAGGGAGTGGCCTCGATGGT	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(704) TCTACCGTTACGCTGCTTCGGAGGGAGTAGCCTCTGTGGT	
	761	800
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(759) CTGC TTCTACGGAGTCCGCTTCTGATTGTCAATGGTTTC	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(759) CTGCTTCTACGGAGTTCCCTTCTGATTGTCAACGGGTTTC	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(759) CTGTGTCTACGGAGTTCCGCTTATGATTGTCAACTGTTTC	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(744) CTGTGTCTACGGAGTTCCGCTTCTAATTGTCAACTGTTTC	
	801	840
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(799) CTCGTGTTGATCACTTACTTGCAGCACCGCATCCTTCGG	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(799) TTAGTTTTGATCACTTACTTGCAGCACCGCATCCTTCGG	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(799) CTCGTCTTGATCACTTACTTGCAGCACCGCACCCCTTCGG	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(784) CTCGTCTTGATCACTTACTTGCAGCACCGCACCCCTTCGG	
	841	880
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(839) TGCCTCACTACGATTGGCTGGAGTGGATTGGTTGAGGGGG	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(839) TGCCTCACTATGACTGGCTGGAGTGGATTGGTTGAGGGGG	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(839) TGCCTCACTATGATTCTTGGAGTGGATTGGTTGAGAGGG	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(824) TGCCTCACTATGATTCTTGGAGTGGATTGGTTGAGAGGG	
	881	920
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(879) AGCTTTGGCTACCGTTGACAGAGACTACGGAATCTTGAAC	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(879) AGCTTTGGCACCCTGTTGACAGAGACTACGGAATCTTGAAC	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(879) AGCTTTGGCTACTGTGGATAGAGACTATGGAATCTTGAAC	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(864) AGCTTTGGCTACTGTGGATAGAGACTATGGAATCTTGAAC	
	921	960
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(919) AAGGTCTTCCACAATATTACCGACACGCACGTGGCGCATC	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(919) AAGGTCTTCCACAATATCAGGGACACGCACGTGGCGCATC	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(919) AAGGTGTTCTAAACATCAGGGACACGCACGTGGCGCATC	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(904) AAGGTGTTCTAAACATCAGGGACACGCACGTGGCGCATC	

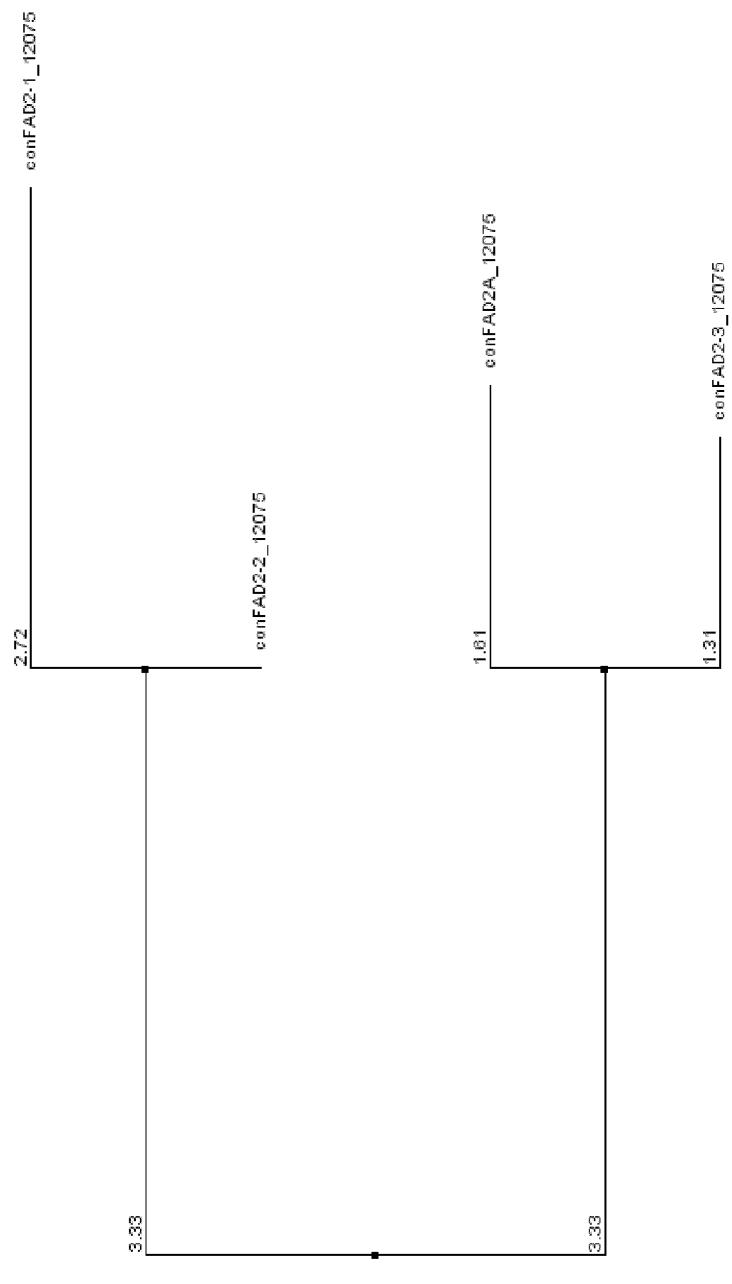
ФИГ.1Д

5/80

ФИГ.1Е		961	1000
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(959)	ATCTGTTCTCCACGATGCCGCATTATCACCGCGATGGAAGC	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(959)	ACCTGTTCTCGACCATGCCGCATTATCACCGCGATGGAAGC	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(959)	ATCTGTTCTCGACGATGCCGCATTATAACCGCGATGGAAGC	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(944)	ATCTGTTCTCGACGATGCCGCATTATAACCGCGATGGAAGC	
		1001	1040
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(999)	TACCAAGGCGATAAAGCCGATACTG-GGAGAGTATTATCA	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(999)	TACGAAGGCGATAAAGCCGATACTG-GGAGAGTATTATCA	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(999)	GACCAAGGCGATAAAGCCGATACTT-GGAGAGTATTACCA	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(984)	GACCAAGGCGATAAAGCCGATACTT-GGAGAGTATTACCA	
		1041	1080
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(1038)	GTTCGATGGGACGCCGGTGGTTAAGGCGATGTGGAGGGAG	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(1038)	GTTCGATGGGACGCCGGTGGTTAAGGCGATGTGGAGGGAG	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(1038)	GTTCGATGGAACGCCGGTGGTTAAGGCGATGTGGAGGGAG	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(1024)	GTTCGATGGAACGCCGGCCTTAAGGCGATGTGGAGGGAG	
		1081	1120
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(1078)	GCGAAGGAGTGTATCTATGTTGAACCGGACAGGCAAGGTG	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(1078)	GCGAAGGAGTGTATCTATGTTGAACCGGACAGGCAAGGTG	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(1078)	GCGAAGGAGTGTATCTATGTTGAACCGGATAGGCAAGGTG	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(1064)	GCGAAGGAGTGTATCTATGTTGAACCGGATAGGCAAGGTG	
		1121	1160
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(1118)	AGAAGAAAGGTGTGTTCTGG-----	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(1118)	AGAAGAAAGGTGTGTTCTGGTACAACAATAAGTTATCTTG	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(1118)	AGAAGAAAGGTGTGTTCTGGTACAACAATAAGTTATGAGG	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(1104)	AGAAGAAAGGTGTGTTCTGGTACAACAATAA-----	
		1161	
FAD2-3 (SEQ ID NO:8)	(1138)	----	
FAD2A (SEQ ID NO:5)	(1158)	CTAA	
FAD2-2 (SEQ ID NO:7)	(1158)	ATGA	
FAD2-1 (SEQ ID NO:6)	(1135)	----	

ФИГ.1Е

6/80



ФИГ.2

ФИГ.3А	1	40
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1) CATCAGACCCCTTCTTCACCACATTTCACTCAGAGGCCAC	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1) CATCGAACCCCTTCTTCACCACATTCCACTTCCCACACTC	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1) CATCGAACCCCTTCTTCACCACATTCCAGTTCCCACACTT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1) CATCAAAC-CTTTCITCACCACATTTCACTGAAAGGCCAC	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1) CATCAAAC-CTTTAATTCAACCACATTTCAGTAAAGGCCAC	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1) CATCAAAC-CTCTCTCCACCACATTTCAGTAAAGGCCAC	
	41	80
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(41) ACAGTTTAG-----AGAGAGAGAGAACATCCCTCAAA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(41) TCTTTTTTTGAATTATAGAGAGAGAACATCCCTCAAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(41) TCTTTTTTT-GAATTATAGAGAGAGAACATCCCTCAAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(40) ACATCT-----AGAGAGAGAACATCCGTCAAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(40) ACATCT-----AGAGAGAGAACATCCGTCAAA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(39) ACAGTTTAG-----AGAGAGAGAACATCCCTCAAA	
	81	120
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(75) GCTCTCTCTCTTCTCCGGCGATGGTTGTCGCTATGGACC	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(81) TCTCTCTCTCTC----CCAGGATGGTTGTTGCTATGGACC	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(80) TCTCTCTCTCTCTCCAGGATGGTTGTTGCTATGGACC	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(68) TCTCTCTC----TCCAGCAATGGTTGTTGCTATGGACC	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(68) TCTCTCTC----TCCAGCGATGGTTGTTGCTATGGACC	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(71) GCTCTCTC--TTTCTCCGGCGATGGTTGTCGCTATGGACC	
	121	160
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(115) AGCGTAGCAATGCGAACGGAGA-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(117) AACGCACCAATGTGAAACGGAGATGCCGGTGCCCCGGAAGGA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(120) AACGCACCAATGTGAAACGAAGATGCCGGTGCCCCGGAAGGA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(102) AGCGCACCAATGTTAACGGAGATGCCGGTGCCCCGGAAGGA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(102) AGCGCACCAATGTTAACGGAGATGCCGGTGCCCCGGAAGGA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(109) AGCGTAGCAATGTGAAACGGAGATTCC-----AAGGA	

ФИГ.3А

ФИГ.3В	161	200
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(137) CGAAAGGTTGATCCGAGCGCACAAACCACCGTTCAAGATC	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(157) AGAAGGGTTGATCCGAGCGCACAAACCGCCGTTAAGATC	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(160) AGAAGGGTTGATCCGAGCGCACAAACCGCCGTTAAGATC	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(142) AGAAGGGTTGATCCAAGCGAACAAACCGCCGTTAAGATC	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(142) AGAAGGGTTGATCCAAGCGCACAAACCGCCGTTAAGATC	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(140) CGAAAGGTTGATCCGAGCGCACAAACCGCCGTTAAGATC	
	201	240
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(177) GGAGATATAAGGGCGGCCATTCTAAGCATTGTTGGGTAA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(197) GGGGACATAAGGGCTGGCATTCTAAGCATTGTTGGGTGA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(200) GGGGACATAAGGGCTGGCATTCTAAGCATTGTTGGGTGA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(182) GGAGATATCAGGGCGGCCATTCTAAGCATTGTTGGGTGA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(182) GGAGATATAAGGGCGGCCATTCTAAGCATTGCTGGGTGA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(180) GGAGATATAAGGGCTGGCATTCTAAGCATTGTTGGGTCA	
	241	280
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(217) AGAGTCCTTGAGATCCATGAGCTATGTCGCCAGAGACAT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(237) AAAGTCCTTGAGATCTATGAGCTACGTAGCCAGAGACAT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(240) AAAGTCCTTGAGATCTATGAGCTACGTAGCCAGAGACAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(222) AGAGTCCTTGAGATCTATGAGCTACGTAGCCAGAGACAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(222) AGAGTCCTTGAGATCTATGAGCTACGTAGCCAGAGACAT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(220) AGAGTCCTTGAGATCCATGAGCTACGTAGCCAGAGACAT	
	281	320
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(257) TTTGCCGTCGTGGCTTGTGGCTCGCCGCGCGTGTATT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(277) TTGTGCCGTCGCCGTTGGCCATTGCCGCCGTGTATT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(280) TTGTGCCGTCGCCGCTGGCCATTGCCGCCGTGTATT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(262) TTTGCCGTCGCCGCTGGCCATTGCCGCCGTGTATT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(262) TTTGCCGTCGCCGCTGGCCATTGCCGCCGTGTATT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(260) TTTCTCCGTCGTGGCTGGCCATTGCCGCCGTGTATT	

ФИГ.3В

9/80

ФИГ.3С	321	360
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(297) GATAGCTGGTTCTTCTGGCCTCTTATTGGGCCGCCCAAG	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(317) GATAGCTGGTTCCCTGTCCCTCTCTATTGGGTCGCCCAAG	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(320) GATAGCTGGTTCCCTGTGGCCTCTCTATTGGGTCGCCCAAG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(302) GATAGCTGGTTCCCTGTGGCCACTCTACTGGGTTGCCCAAG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(302) GATAGCTGGTTCCCTGTGGCCACTCTACTGGGTTGCCCAAG	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(300) GATAGCTGGTTCTTCTGGCCTCTTATTGGGCCGCCCAAG	
	361	400
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(337) GAACCTGTTCTGGGCTATCTTCGTACTGGCCACGACTG	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(357) GAACCTTTCTGGCCATCTTCGTCCTGGCCACGACTG	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(360) GAACCTTTCTGGCCATCTTCGTCCTGGCCACGACTG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(342) GAACCTTTCTGGCCATCTTCGTTCTGGCCACGACTG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(342) GAACCTTTCTGGCCATCTTCGTTCTGGCCACGACTG	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(340) GAACCTTTCTGGCCATCTTCGTACTGGCCACGACTG	
	401	440
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(377) GTAATTAAATT-----TCTTCAACTTCTTAA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(397) GTAA-----AGTT-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(400) GTAA-----AGTT-----	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(382) GTAAATTAAATT-----TCTG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(382) GTAAATTAAATT-----TCAG	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(380) GTAATTAAATTCAATTATTCTTCAACTTCTTAA	
	441	480
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(406) TTTTGATATGTTATATGTTTTTCTGTTTGCATTGT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(406) CTTCCAT-----TTTGCATTGC	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(409) CTTCCAT-----TTTGCATTGC	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(399) TTTTAT-----TATTTGACT-CTTTTGTTCAAATT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(399) TTTTAT-----TATTTGTCT-CTTTTGTTCAAATT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(420) TTTGATATGTTATATGTTTT-CGTTTTTGCACTCGT	

ФИГ.3С

10/80

ФИГ.3Д	481	520
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(446) CTTTGATTCCTGACCGTACGTTGGATATGAGATTTTC--	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(423) ATCG-ATTTATTGAATGCACGTTCTACGAGT-ATTGTTG	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(426) ATCG-ATTTATTGAATGCACGTTCTATGAGT-ATTGT---	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(431) ATTA-ATTTCTTGAATGCACGTTGGATGAGT-ATCGTCGT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(431) ATTA-ATTTCTTGAATGCACGTTGGATGAGT-ATCGTC--	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(459) CTTTGATTCCTGACCGTACGTTGGATATGAGATTTTC--	
	521	560
FAD3A (SEQ ID NO:15)	--ACTGACTTCAAGATTGATTCTCTTCAGGTTACTTTT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(461) TCAGTTACTTCGTAATAATTGATTCTTTGATGTTCATTTTT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(461) -CAGT-ACTTTATGAATTGATTCTTTGATGTTCATTTTT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(469) -CAGT-GACTTCAAGATTAAATTCTTTGAGGTT-ACCTTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(467) --ACTGACTTCAAGATTAAATTCTTTGAGGTT-ACCTTT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(497) --ACTGACTTCAAGATTGATTCTCTTCAGGTTACTTTT	
	561	600
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(522) TTCAATTAAATTATTATGTTCATCCATTGGCCTATT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(501) TGAAGATCTAAG-ATTT-----TTT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(499) TGAAGATCTAAG-ATTT-----TTT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(507) T-CATGTTCAATTATTA-----AA-----AAAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(504) T-CATGTTCAATTATTA-----AA-----AAAT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(535) AAAAAGGGGATCTAAGATTTTAATTGTTCACCCATTGGCCTATT	
	601	640
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(562) TAAAAGCAAAGGGGATCTAAGATTTTAATTCTTTGTT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(520) T-----TTT-AGATTTCT-TTTAAATCA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(518) T-----TTTAGATTTCT-TTTAAATCA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(529) AAAATAAAATATAGGATCTAAGATTTT--TTCTTCATCA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(526) AAAAGAAAATATAGGATCTAAGATTTT--TTCTTCATCA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(575) TAAAAGCAAAGGGGATCTAAGATTTTAATTCTCTCT	

ФИГ.3Д

11/80

ФИГ.3Е	641	680
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(602) TTTTTTGGT-----TCTTTTCATCAG-T	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(543) TTGTTCCACCACCA-----CCTTTCATCGG-T	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(542) TTGTTCCACCACCA-----TTTCATCGG-T	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(567) --GTTCAAGCA-----TCATCACTCATCAG-T	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(564) ATGTTCAAGCA-----TCGTCACTCATCAG-T	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(615) TTTCAGTCGTAACACTGCTAACTT-----GATCAAAT	
	681	720
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(626) CGTAACACTC-----CTAACTAAACATCTTTCTTTC	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(569) CGTACGACTC---GTTACAAACACCAACATCTT--TATTT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(565) CGTACGACTC---GTTACAAAACCAACATCTT--TATTT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(591) CGTAAGACTC-----GTAACAAAATATCTT---CTTTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(590) CGTCAGACTC-----GTAACAAAATATCTT---CTTTT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(655) CGTAACACTCATAAGTCCTAACTAAACATCTTTCTTTC	
	721	760
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(659) CTATAATTATTGTTGTTCCGCCTTTATGGATCTACGTT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(603) CTATAATTACTACTGCTTCCGCATTTATGGATCTCTCAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(599) CTATAATTACGACTGCTTCCGCATTTATGGATCTCTCAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(621) CTATAATTAATATTATTTCCGCATTTATGGATCTACGTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(620) CTATAATTAATATTATTTCCGCATTTATGGATCTACGTT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(695) CTATAATTATTGTTGGTTCCGCATTTATGGATCTACGTT	
	761	800
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(699) T-GAAATTTCAA-----TAAAAAC---	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(643) CTTATAATTAAAG-----TATAATATC	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(639) CTTATAATTAAAG-----TATAAAATC	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(661) TTGATGTTCTCAATTGGTTCTCTCTCTAGATCCCC	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(660) TTGATGTTCTCAATTGGTTCTCTCTCTAGATCCCC	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(735) T-GAAAGTTCAA-----TAAAAAC---	

ФИГ.3Е

12/80

ФИГ.3F		801	840
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(717)	--- A CATTTATTGTT-TTCT-GTA--- A CAATT-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(665)	AAGAA T ATCTATTATTTTCTTAAACAAAGA-AAGAT-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(661)	AAGAA T ATCTATTGTTTTCTTAAACAAAGA-AAGAT-----	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(701)	GGAA C TTTAATTATAATTATAGTATAGTATAATATCAAG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(700)	GGAA C TTTAATTATAATTATAGTATAGTATAATATCAAG	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(753)	--- A CATTTATTGTT-TGAAAGTA--- A CAATAT-----	
	841		880
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(744)	-- A AT-TACTGTTTATTGGTC-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(700)	-- A AT-- A TTGTTTCTTGTTA-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(696)	-- A AT-- A TTGTTTCTTGTTA-----	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(741)	AAA A TACTGTTTATTTTTGGCAACAAATATATTAC	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(740)	AAA A TACTGTTTATTTTT-GGCAACAAATATATT--	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(781)	-- A AT-TACTGTATATTGATTC-----	
	881		920
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(763)	----TTT----- A ----- A TTA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(718)	-----	TTT
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(714)	-----	TTT
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(781)	TCTTGTTCTTGACAAGAAAAAA A TATATTGTTTTTC	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(777)	----GTTT-TTGACAAGAAAA--TATATTGTTTTTC	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(800)	----TTT----- A ----- A TTA	
	921		960
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(772)	TTG T G T T-GTTCCAATCTATTTC G AAATATAGTC T G	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(721)	TGG T G T T---TTCCAATCTA-TTTC G AGATTAGAA A T G	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(717)	TGG T G T T---T-CCAATCTA-TTTC G AGATTAGAA A T G	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(821)	TTCTTTTG T GTTCCAATCTATTTC G AGATTAGAC A G	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(810)	TTCTTTTG T GTTCCAATCTATTTC G AGATTAGAC A G	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(809)	TTG T G T T-GTTCCAATCTACTTT G AAATATAGTC T G	

ФИГ.3F

13/80

ФИГ. 3G	961	1000
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(811) TGACACGTCAATTCTATTCTTTGTTACCTTGTGAACGT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(757) TGACACGTCA-----TACCTTGTGAAGTGT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(752) TGTACCGTCAT-----TACCTTGTGAAGCTT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(861) TGACACGTCAATAACGGATTTGTACCTTGTAAAGACT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(849) TGACACGTCAATAACGGATTTGTACCTTGTAAAGACT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(848) TGACACGTCAATTCTATTCTTTGTTACCTTGTGGAACGT	
	1001	1040
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(851) TTG-----AATTGAGGAAAGTTCA GTTAACATTGT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(784) TTA-----AAACAAACATGGAAAGTTAAATAA-ATAGT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(779) TTA-----AAACAAACATGGAAAGTTAAATAA-ATAGT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(901) TTGGGTTAAACAAATGTAGAAAAGTTAAATAA-ATTGT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(889) TTGAGTTAAACAAATGTAGAAAAGTTAAATAA-ATTGT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(888) TTG-----AATTGAGTAAAGTTAATTAACATTGT	
	1041	1080
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(881) GCAATAATGATAAA-TGTGTTT-----ATGAT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(817) GCAATAATGATAAA-TATGTAT--ATGATGAATAATGAT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(812) GCAATAATGATAACTATATT--ACGATGAATAATGAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(940) GCAATAATGATAAA-TACGTTTTATGTTAACAAATGAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(928) GCACTAAATGATAAA-TACGTTTTATGTTAACATAATGAT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(918) GCAATAATGATAAA-CATGTTT-----ATGAT	
	1081	1120
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(908) GTAAAAATTCAATTGAATAATA-CAGTGGACATGGGAGCT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(854) GTGAAA-TATAATTGAATAATGGCAGTGGACATGGGAGTT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(850) GTGAAA-TATAATTGAATAATGGCAGTGGACATGTGAGTT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(979) GTGAAAATAAAATTGAATAATGGCAGTGGACATGGGAGTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(967) GTGAAAATAAAATTGAATAATGGCAGTGGACATGGGAGTT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(945) GTAAAAATTCAATTGAATAATA-CAGTGGACATGGGAGCT	

ФИГ.3G

14/80

ФИГ. ЗН		1121	1160
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(947)	TCTCAGACATTCCCTCTCTGAATACTCGGGTTGGTCATAT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(893)	TCTCAGACATTCCCTCTGCTGAATAGTGTGGTTGGCCATAT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(889)	TCTCAGACATTCCCTCTGCTGAATAGCGTGGTTGGCCATAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1019)	TTTCAGACATTCCCTCTGCTGAACAGTGTGGTTGGTCACAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1007)	TCTCAGACATTCCCTCTGCTGAACAGTGTGGTTGGTCACAT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(984)	TCTCAGACATTCCCTCTCTGAATACTCGGGTTGGTCATAT	
		1161	1200
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(987)	TCTTCATTCCATTCTCGTTCCATACCATGGTTGGTAA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(933)	TCTTCATTCCATTCTCATCCTCGTTCCATTACCATGGTTGGTAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(929)	TCTTCATTCCATTCTCATCCTCGTTCCATTACCATGGTTGGTAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1059)	TCTTCATTCAATTCTCATCCTCGTTCCATTACCATGGTTGGTAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1047)	TCTTCATTCAATTCTCATCCTCGTTCCATTACCATGGTTGGTAA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1024)	TCTTCATTCCATTCTCGTTCCATACCATGGTTGGTAA	
		1201	1240
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1027)	GTCAT-TTATTTAACCTCTTTTCATGCAA---TTTA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(973)	GTCAGCTTATC-AACC-CTTTT--ACTAT-ATTATTAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(969)	GTCAACTTATT--AACCT-CTTTT--ATTATTATTATTAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1099)	GTCAT-TTATT--AAC---TATTTCATGTAAACTATTAG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1087)	GTCAT-TTATT--AAC---TATTTCATGTAAATTATTAG	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1064)	GTCAT-TTATTTAACATCTTTT-CATGCAA---TTTA	
		1241	1280
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1063)	TTCTTGTTCGATTTCTTACATTTCTT-GTCATTCT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1007)	TTATTAACATTGCATTGAT-ATACTT-----GGTGCAAGT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1004)	TTATTAACATTCTATTGTTATACTTTTTGGTTAAAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1133)	TACCTGTTTCGTATTTCTTACATTTCGTTGTCATTCT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1121)	TACCTGTTTCGTATTTCTTACATTTCGTTGTTATTCT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1099)	TTCTTGTTCGATTTCTTACATTTCTT-GTCATTCT	

ФИГ.ЗН

15/80

ФИГ.3I		1281		1320
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1102)	T----GGTGCA-TGTTAGCAAAACAGTAATCTGA--TAACT		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1041)	TGGTAAATGTAATCTGATAACTGAA-AATCTAT--TCATT		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1044)	-GTTAAATGAATTACTTGGTGCAAG-AATCTAT--TCATT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1173)	TCTTGGGTGCA-TGCTAGCAAACGTAAATCAGTATTAACT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1161)	T---GGGTGCAATGCTAGGAAACTGTAATCAGTATTAACT		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1138)	T----GGTGCA-TGTTAGCAAACGTAAATCTGA--TAACT		
	1321			1360
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1135)	GAAAA-----TATATTAATT-----TT		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1078)	GCTCTTCTA----TTTTTTTTGGCT-AGAGACAATT		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1080)	GCTCTTCT-----TTTTTTTTGGCT-AGAGCCAATT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1212)	GGGAACCTACCAACTGTTTTTTCTAGAGTAGCAATT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1198)	GGAAAGCTACCAACT-TTTTTTGTGCTAGAGTAGCAATT		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1171)	GAAAA-----TATATTAATT-----TT		
	1361			1400
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1152)	TCATAGTAAAATAA-----TGCATGTG		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1112)	TTATAATTAAATAATGCATGTGAGAATATGACTATTATG		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1113)	TTATAATTAAATAATGCATGTGAAAGTATGACTATATG		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1252)	TTATAATTAAATAAGAACCTATTAA--AACAAATGCATGTG		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1237)	TTATAATTAAATAAGAACCTATTAA--AACAAATGCATGTG		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1188)	CCATAGTAAAATAA-----TGCATGTG		
	1401			1440
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1174)	ACTAAAAGCA-----TCAAAA-----TC		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1152)	TGAGGTTAGCTTTCTTATTCTGTGCGAAAAGCATCAAATC		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1153)	TGAGGTTAGCTTTCTTATTCTTGACGAAAAGCATCGAAC		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1290)	ACAATATGAGGTTGCTTT-CTGTTCAAAA---CAAATC		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1275)	ACTATATGAGGTTGCTTTCTGTTCAAAAAGCATCAAATC		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1210)	ACTAAAAGCA-----TCAAAA-----TC		

ФИГ.3I

16/80

ФИГ. 3J		1441		1480
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1192)	TTTACGATCGAAGAAAAAGAA-CCAAACTTTATT--A		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1192)	TTTAGCAACGAAGGAAAAGGAATCAAATTTTTATT-AA		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1193)	TTTAGCAACGAAGGAAAAGGAATCAAACTTTATT-AA		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1325)	TTTAGAAGCCAATGAAAAGAATCCAAAACTTTTAA		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1315)	TTTAGCAAGCCAATGAAAAGAATCCAAACCTTTCTT-AA		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1228)	TTTAGCATCGAAGAAAAAGAA-CCAAACTTTATT--A		
	1481			1520
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1229)	ATGCTATGGGCCTATTATGG-----TCCA-----		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1231)	ATGCCATGGGTCTATGTCTTGG-----TCATTAGTTT		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1232)	ATGCAATGGGCCTATACT-GG-----TCATTAGTATT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1365)	ATGATATGCGCCTATCTATTGGTCCTGACTCCTGAGTTT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1354)	ATGATATGCGCCTATCTATGG-----TCCTGAGTTT		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1265)	ATGCTATGGGCCTATTATGG-----TCCA-----		
	1521			1560
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1254)	-----A--TTAGCTATTATCATATGAC-ATGTCCTTG		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1264)	TTCATATAATTATTTATATTCTAACAGCAGCT		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1264)	TTGAATATAATTATTTATAATTCTTGAACAAACAGCT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1405)	CTTACTTTC--TTAAGTATAATTAGATTGATTCTTT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1386)	CTTAGTC--TTAAGTATAATTAGATTGATTCTTT		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1290)	-----A--TTAGCTATTATCATATGAC-ATGTCCTTG		
	1561			1600
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1283)	AA-----TAAATTATGT-A-----TAAGTT		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1304)	AATTAAATTATAATTAAATTATTCACTTATAAATAATT		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1304)	AATTATTATAATTAAATTATTCACTTATAAATAATT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1443)	TATAGTTT-TCACT-TTGTATTTGTTACATCAGCTT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1424)	TA-GGTTT-TCACTTATTGTTATTGTTACATCAGCTT		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1319)	AA-----TAAATTATGT-AGCTTCAATATGAGTT		

ФИГ.3J

17/80

ФИГ.ЗК	1601	1640
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1304) AATAT-----	AATATTTAT--A
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1344) AGACCAATTATTAAAGGTTAGATATTTAAGAATTATTCA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1344) AAACCAATTATTAAAGGTTAGATATTCAGAGAATTATTCA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1481) CAGATCTTCGAAA-----	AAGATTTAC--A
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1461) CAAACATCTTCGAAA-----	AAGACTTAC--A
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1350) AAT-----	AATATTTAT--A
	1641	1680
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1319) TATATTTGTTT-----TAATGGCTTAT---TTTA-T	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1384) TGACTTTGTTTATTGGAA----CTCCTTTATCTTTAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1384) TGACTTTGTTTATTGGAAATTACTCCTTTATCTTTAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1506) TGCAATCAATTCATGAGGATTATAGTTTTCT-TTTACT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1486) TGCAATCAATTCCTGAGGATTATACTTTT---TTTACT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1363) TATTTTTGTTT-----TAATGGCTTAT---TTTA-T	
	1681	1720
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1346) TGTAA-----AATGGATAC----ATCAGCTTGAAATA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1419) TCTTTT---CTATTCTCCATTAAATATGAGAAACTG	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1424) TCTTTT---CTATTCTCTATTAAATATTGAGAAACTG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1545) TATTTCCGACACAATGTTAGTAGTAAAAGCATAAATG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1523) TATTTCTG-CACAATGTTATTAGTAAAAGCATCAAATG	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1390) TGTAA-----AATGGATAC----ATCAGCTTGAAATG	
	1721	1760
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1374) TCT-----ACGAACAT-GCATCATTTCCTAGAT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1456) ACTTCAAACTCCATAAAAGATGGCTTATGTAGTAAACAG	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1461) ACTTCAACCTCCATAAAAATGGTTCTGTAGTAAACAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1585) TTTTTTG-CTCAAAAAAAA-GAATGGGATTGTTAGAG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1562) TTTTTTG-CTCAAAAAAAA--GAATGGGATTGTTAGAG	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1418) TCT-----ACGAACAT-GCATCATTTCCTAGAT	

ФИГ.ЗК

18/80

ФИГ.3L	1761	1800
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1402) A--- <u>CATTTGTTGGTCAAAAAATGAATAACGTAGTT</u>	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1496) TA-TAATTTTTGTTGGTAATGTAACATCATCTTCAAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1501) CA-TAATTTTGTTGGTAATGTAACATCATCTTCAAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1623) CACTCTATTGTTAGTTGTT <u>CAATAAAATACCAACTAAAA</u>	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1598) CACTCTATTGTTAGTTGTT <u>CAATAAAATATACTCAACTAAAA</u>	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1446) A--- <u>CATTTGTTGGTCAAAAA-TGAATAACTTAGTT</u>	
	1801	1840
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1439) AAC----- <u>GAGTGAGA-----</u>	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1535) TAT <u>CTTGAAATAGACTTACATGCCATTATTTGCTGC</u> GA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1540) TAT <u>CTTGAAATAGACTTACATGCCATTATTTGCTGC</u> GA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1663) AACAAAATAAATATA---AAAT <u>GAGTGAGATTGTTAAAT</u>	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1638) AACAAAATAAATATA---AAAT <u>GAGTGAGATTGTTAAAT</u>	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1482) AAC----- <u>GAGTGAGCATGTTCTAT</u>	
	1841	1880
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1451) ----- <u>TTCTTAG-----</u>	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1575) CATTATTGTC <u>ACTTATTCCCTGGCAATAAT-TAGTTATT</u>	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1580) CATTATTGTA <u>ACTTATTCCCTGGCAATAAAAATAATTATT</u>	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1700) CATTAT <u>AGAGACAATTTCATTTCACAAAAATAAAATAAT</u>	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1675) CATTAT <u>AGAGACAATTTCATTTCACAAAAATAAAATAAT</u>	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1503) GGGG----- <u>TTCTTAGAGCATGATTATT</u>	
	1881	1920
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1458) -----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1614) ACTG-A <u>ACTTTTTTGGTCAATTATTACTAGTAACIT</u> T	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1620) ACTGGAA <u>ACTTTTTGGTCAATTATTACTAGTAACIT</u> A	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1740) ACAT-- <u>ACTTTTATAATTGGGGTTGCAGGAGAATAAG</u>	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1715) ACAT-- <u>ACTTTTG-TAATTGGGGTTGCAGGAGAATAAG</u>	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1527) GAGA-- <u>AGTTCCATA-GAGTGAGGTTCTTACCGGAATATAA</u>	

ФИГ.3L

19/80

ФИГ. 3М		1921	1960
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1653)	AAACTAAAAGAGTGAGATTGTTGATCAAAAAAAAT---	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1660)	AAACTAAAAGAGTGAGATTGTTGATCAAAAAAAAGAG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1778)	CCATCGGACACACCACAGAACCATGCCATGTTGAAAAC	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1752)	CCATCGGACACACCACAGAACCATGCCATGTTGAAAAC	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1564)	GAATCTATCTCTTAACCTTTAACTAAAGAAACCTAAAGAAC	
		1961	2000
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1690)	--AAAAATAGAGTGAGATAGTTAGAATCTGCCATGAAAG	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1700)	AAAAAAAATAGAGTGAGATTGTTAGAATCTGCCATGAAAG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1818)	GACGAGCTTGGGTCCGGTAATCTTCCTACTCTCGTAG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1792)	GACGAGCTTGGGTCCGGTAATCTTCCTACTCTCATTG	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1604)	GGCTTTAAAACCTCGTATTTAAGAACCGTTTTAGTTT	
		2001	2040
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1727)	CAACACTATATAG-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1740)	CAACACTATATAGGTGATGATTGGTTGACTGTGCCGTA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1858)	TTTCTCTGTCTTTATTTATTTGTTGTTTCGGAATT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1832)	TTTCTCTGTCTTTATTTATTTGTTCTTTTGGATT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1644)	TTTAGTTAAAATCAAGAGACGAGTTCTTATATTCCGCTA	
		2041	2080
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(1780)	GAATTAGCTGTAGATAAATTGGTTGAGTTGAAAGTT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(1898)	TATTCTTA--TGTC--TATGTTCTAGGATTCTATATGTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(1872)	CATTCTTA--TGTC--TAAGTTCTATGATTATTGAAGTT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(1684)	AGAACTCC--ACCC--TGAGAACCTCTCAATAATCATGCT	

ФИГ.3М

20/80

ФИГ. ЗН	2081	2120
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (1820)	GTTACTGTT-GATTATTTTGCAGAGACTTTGCTGTAGT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (1934)	TATTTTATTAGTTATGTTTCAGTCTGAGGTCA-GACCG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (1908)	CTTAAGGTGGGTTCTAACGGATATGAGAACCTGTCTC	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (1720)	CTTAGTGCTCTAACAGAAGGGTCCTAACAAAATAT-----	
	2121	2160
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (1859)	TAAATTGTTGTAAGCTATAGGCTGCAGATAATT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (1973)	ACCACCTGTCAG-----ATCTGTTTCTAGCTG-----AG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (1948)	TTAACCTTTAACAAAAA-AAGCTAACGAGCTTTAAA	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (1754)	--TAAATAAAG-----ATATAGTGTGGGCCAA-----	
	2161	2200
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (1899)	TAAAATAAAATATGTAAAAATATGTGATGCATGTATAATA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2004)	TAAAA-----AACAA-TTGCAGTGTAAATAGTTAG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (1987)	TAAGAGTTTATGAACACGTTCTTAATTTTTTAGTTAAA	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (1781)	-AAAA-----AACAAAAAACGGTTACAAAAGTCGCG	
	2201	2240
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (1939)	AAATAATTATTATTTTTATCACTTAAAT-AATTATAATT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2035)	CATAATTGATCTTGT-----AGAGCAT-TT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2027)	AGTTAACGAAACGGGTTCTTATATCCGCTAACGAAACCTCTT	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (1812)	AAAGAAGGATCGATTT-----TGGTCTTTA	

ФИГ.ЗН

21/80

ФИГ.3О	2241	2280
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (1978)	AATTTTTTAAATTATCAAAGTTACTGTTATTTAAAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2060)	CCAAA-----CAA-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2067)	CCTAAAACCCCATAATCATACTC--CTAGGATTCTATA	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (1838)	CTTGTAA-----	
	2281	2320
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2018)	TGTGATATGTAATAATCTATATTATTTAAAATATTCAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2069)	-----ACTTTATAATTAAATATAACAGT-TT-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2105)	TGTT-TATTTTATTAGTTATGTTTCAGTCTGAGGTAG	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (1844)	-----CTGTTTGTTGGATCCCACGGTGGT-----	
	2321	2360
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2058)	TAATTAAAAGCACCCAAATTAGAGTAAAATATTATAG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2095)	-----TT-----TGTTCTCT-----AAAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2144)	ACCGGCCACTTGTCAAGATCTGTTCTAGCTGTAGTAAA	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (1868)	-----GGTCGCG-----ATTG	
	2361	2400
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2098)	ATGTTTTTATTATGATTATCTTATT--TATTTAATT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2109)	AAGAATT-----AAAAATT-----TTAAAGTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2184)	AACAATTGCAAGTGTAAATAGTCAGCGTAAATTATGTT	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (1880)	GTTTCTT-----TTTAATT-----TAATTATTT	

ФИГ.3О

22/80

ФИГ.ЗР	2401	2440
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2136)	ATAGATATTTTGTCTTACAGTTCTACAGCTTATAAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2132)	TGAGGGACGA-----AACTTCAAATT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2224)	CTCGGATCTATCTCAAAAAAAATTTATAACTTCAAATA	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (1906)	TTTAACGGA-----GAAAAAAATTAA	
	2441	2480
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2176)	TGAAAGATGTAAGTTGTTAACTAAAATACATAAGAA--	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2153)	TGAAC-----TTTCACTACTCAACTTC-AAATT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2264)	TAAAGATTTTGTGTTCAAAATGAACCTTCGAAACTT	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (1927)	AGAAA-----C---CAAAAAACAGTTT-----AA	
	2481	2520
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1458)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2213)	-AAATGTTGGTTTTTTGCTGTAGCTTATTTAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2181)	GAAATTTCATCTTTTATTTACATTTGATCATTATAAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2304)	CAAATTGAAGTTTTTTTGATCATTATAAT	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (1949)	TCATGGCCTCATGTTGGGTTGAGTTATATTCTGATAA	
	2521	2560
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1458)	-----CA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1740)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2252)	-AGTTAAAGCATG-ATTGGTAAAAATTAAATAGAAATTGA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2221)	TAATTATACATTACATTATGATTCTTAAGTATTCTCA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2344)	TAATTACACGTTACATTATAATTCTTAAGTATTCTCA	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (1989)	GAATCCCCTTAAACCCCGTAAACATGCTCTTACCA	

ФИГ.ЗР

23/80

ФИГ. 3Q	2561	2600
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1460) TCTGCC-----TCGAAAACG---ATATGTTATTGAC	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1740) -----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(2290) TGTAGACTTAATTGAAAAGT---AACGTAAAGCAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(2261) TTTATTGTTTAATTCTAAATTGTTATACATCATAAAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(2384) TTTATCGTTTAATTCTAAATTGTTATACATCATAAAT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2029) TCTGCT-----TCGAAAATG---ATATGTTATTGAC	
	2601	2640
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1488) AATTCCAA---TTTCAT--TTT-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1740) -----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(2326) GATTGGTAAAGTTAATGATTTAGAAA--AAAATAAGCT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(2301) ATTTCCAA---TTTGTT--TTTATAATTCAAATTACA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(2424) ATTTCCAA---TTTGTT--TTTATAAAATTCAAATTATA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2057) AATTCCAA---TTTCAT--TTT-----	
	2641	2680
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1505) -----TATGAAAA---TAA-AAT-----AA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1740) -----	AC
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(2364) AAAGTAGGTAGATAAAACCAACCAATCACCTCCATGGAC	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(2336) CAAAAAAAGTAATAAAATTGTTA---AAT-----AA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(2459) CATAAAAGTAATAAAATTGTTA---AAT-----AA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2074) -----TATGAAAA---TAA-AAT-----AA	
	2681	2720
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1521) TAGTT----TATTT-----TATAATTGGGGTTGG---	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1742) AATTTAATTGTTATGAAAACACAT--TTAATAATTGAG-	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(2404) AATTTAATTGTTATGAAACACATATTAAATAATTGAG-	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(2363) GATTTATAATTGTTAAAC-TATAATTAGCAACAAAAAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(2486) GATTTATAATTGTT-AAGAC-TATAATTAGCAACAAAA-	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2090) TAGTT----TATTT-----TATAACTGAGGGTTGG---	

ФИГ.3Q

24/80

ФИГ.3R		
	2721	2760
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1546)	--TTGCAGGA-----CAATAAG-----CCATCGG	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1779)	-GCTGCAGGA-----CAATAAG-----CCATCGG	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2443)	-GCTGCAGGA-----CAATAAG-----CCATCGG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2402)	TATTACAAA-AAATGTAAATA--AACATTAAAATAAC	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2523)	TATTACAAAAGAAATGTAAATAATAAAAAATTAAAATAAG	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (2115)	--TTGCAGGA-----CAATAAG-----CCATCGG	
	2761	2800
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1568)	ACACACCAC--CAGAACCATGGCATGTTGAAA---ACG	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1802)	ACACACCAC--CAGAACCATGGCATGTTGAAA---ACG	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2466)	ACACACCAC--CAGAACCATGGCATGTTGAAA---ACG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2438)	ATATATCAAGACATAATTATTAGAAATTAAATATTATA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2563)	ATACATGAAGACATAACTATTAGAAAATTAAATATTATA	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (2137)	ACACACCAC--CAGAACCATGGCATGTTGAAA---ACG	
	2801	2840
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1602)	ACGAGTCCTGGGTTCCGGTAA-----TC-----CCCTTC	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1836)	ACGAGTCCTGGGTTCCGGTAACATT--TC-----CCCTCTT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2500)	ACGAGTCCTGGGTTCCGGTAACATT--TC-----CCCTCTT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2478)	ACAATATTAAATAACTCTGGTAAATTGCTCCAAACCTCAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2603)	ACAATACTAATAACTCTGGTAAATTGCTCTGGAACCTCTA	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (2171)	ACGAGTCCTGGGTTCCGGTAA-----TCTTTC-CCCTTC	
	2841	2880
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1631)	TCATT-----ATTTTTTTT-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (1869)	TAATA-----ATT-----TCTATTTTCT-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2533)	TAATA-----ATT-----TCTATTTTCTT--T--	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2518)	AAATTCTAAATTATTGTCCAACAAATT-GTTAACCG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2643)	AAATT-----ATTGTCTAAACAAATTGTGTAAACCG	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (2204)	TCAT-----ATTTTTTTT-----	

ФИГ.3R

25/80

ФИГ.3S	2881	2920
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1645) -----TCTTTTTGAAAC-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1888) -----GTCAAAAATAATTAGTTTCGAAATTTGAGG	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(2554) -----GTCAAAAATAATTGTTTCGAAATTTGAGG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(2557) AATATGGAGCATTACAAAATAATTATGGATAGTGTG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(2675) AAGATGGAGCATTACGAAAATAATTATGAATAATATG	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2217) -----CTTTTTTGAAAT-----	
	2921	2960
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1659) -----T--CTTCATTTAATTTCCT-	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1919) CCAGAACGACCACTTGTCAA-ATTGATT-TTAGCTGTA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(2585) CCAGAACGACCACTTGTCAAG-ATTGATT-TCTAGCTGTA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(2597) GTATTTGCTTAGTT-AATATTTAATTATGTATTCTA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(2715) GTATTTGCTCTAGTTAATATTTAATTATATTTCTA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2231) -----T--CTTCATTTAATTTCCT-	
	2961	3000
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1678) --TAGAATTCTATGTATT-----TTTAATCA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1957) GTAAAAACAGTTGCTAGTGTACACAGTTAACCGGTTAATTG	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(2623) GTAAAAACAGTTGCTAGTGTACACAGTTAACCGGTTAATTG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(2636) TTTATAATTTTATATTTAATGTAAGATTTTTAATTAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(2755) TTTATAATTTTATATTTAATGTAATTTTTAATTAA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	--TAGGATTCTATGTATT-----TTTAATCA	
	3001	3040
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1705) ATCC-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(1997) ATTCTTTTAACGATTTATAGAAGTAACATTTGTAAAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(2663) ATTCTTTAGCGATTTATAGAAGTAACATTTGTAAAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(2676) ATATTACTGTAAATTTTATATATGTACTAGTTATTTAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(2795) ATATTACTGTAAATTTTATATATGTGCTAGTTATTTAT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2277) ATCC-----	

ФИГ.3S

26/80

ФИГ.3Т	3041	3080
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1710)	-----TTTT-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (2037)	TAAAAATAACATTATGGTATGTGACAACGGACACGCTTA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2703)	TAAAATATACTAAATAGTATGTGACAACGGACACGCCTA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2716)	AAAAGTTT-ATAGATTGTATTAGTTATAACAAAAATAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2835)	AATTTCCTTATGGATTATATTAG---ACCATGATTAA	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (2282)	-----TTTT-----	
	3081	3120
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1714)	-----C-----CAGTG	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (2077)	TTTGTATTGGTGAATCTTTAATTAC-TC--CCT-CCAAT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2743)	TTTGTATCGGTGAATCTTCTAATTAC-TT--CCT-CGAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2755)	GGATCATTTGTGTAAATAACAAATAATTGAAATTACGTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2871)	CCCGGAGTTCTTAGAGTG-----GAGTTTAGTT	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (2286)	-----C-----CAGTT	
	3121	3160
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1720)	TGAGGCTTG-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (2113)	TTATTTAGTTGCAGATTAGATTATGCACATAGATTAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2779)	TTATTTAGTTACAGTTTAGATTATACACATAGATTAC	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2795)	TAAGTTTGGTTATGAAAAAAACTTTGAAACTTTAAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2900)	AAACGTT-----AAGAACAGTTCTTAACCTCCG	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (2292)	TGAGGCTAG-----	
	3161	3200
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1729)	-----G---ACGACCACTTGTCAGATTGTCG--	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (2153)	TAAAAATA----TTTGCACATTTCAAAATAAAACAC	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (2819)	AAAAATAAAATATTGTCCATTTTAAATAAAACAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (2835)	TTTAGAGTTTGCAAACTTTAAATGTTAGATAGATACTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (2930)	GTAAGAACCCATCTAAGAACTCCAGGTAAATC---	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (2301)	-----G---ACGACCACTTGTCAGATTGTCG--	

ФИГ.3Т

27/80

ФИГ.ЗУ	3201	3240
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1753) ----- <u>T</u> -----TTAGCTGTAG-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2188) CATTAC-TTATACAACCTAACCATATTCACCAATAAAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(2859) CACTAA-TTATACACCTAACAAATTAAACCAATAAAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(2875) TTTTGAGATGCATTAGTGGTATGGTAGTAACTCAGA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(2964) -----ATGCTCTTAGTTATAA-----CAAA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2325) ----- <u>T</u> -----TTAGCTGTAG-----	
	3241	3280
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1764) -----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2227) --TAAATTAGAAAATATTATTTATAAATTGTATTGAAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(2898) A-TAAACTAGAAAATATTATTCATAATTTTACATTGAAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(2915) AAATGAAAATCTATACCTTATACTCCCTCCGTTTTA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(2984) TAAGGATCATTGTGTA-----A	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2336) -----	
	3281	3320
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1764) -----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2265) TTATAAAATAACTTATTTAAACGAAATT-----AA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(2937) TTATAAAACGATACTTATTTAAACAAATTT---AA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(2955) ATATAAGTCGTTTACAGTTATACACGTAGATTAAGAAAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3002) ATACAAATAATTGAAAGTTATGTTGAAGTTG-----	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2336) -----	
	3321	3360
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1764) -----T-----AAACAACTG---	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2299) TTTACAAACGACAATTAAACTGAAACGGAAAGAAATTATTA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(2973) TTTACAAACGACAATTAAATTGAAACGGAAAGAAGTTATTA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(2995) CCATTAAATTCTTATATTTCTAGACAAAAACATCATTAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3036) -----TTTTC--GAAGAAACCACTTGA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2336) -----T-----AAACAACTG---	

ФИГ.ЗУ

28/80

ФИГ.3V	3361	3400
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1774)	-- <u>ATTTA</u> -----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (2339)	<u>ATAC</u> <u>TTA</u> <u>ATTAAAGAGTTTTT</u> ----- <u>AGAAAAATTGAA</u>	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (3013)	<u>TTAC</u> <u>TTA</u> <u>ATTAAAGAGTTTTT</u> ----- <u>TAAAAAAAATGAA</u>	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (3035)	<u>TTAT</u> <u>TTA</u> <u>CCTAACCA</u> <u>CAATTCAACCA</u> <u>ATATAAAATAGAA</u>	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (3058)	<u>AACT</u> <u>TTA</u> ----- <u>AATTTAGAGT</u> --- <u>AA</u>	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (2346)	-- <u>ATTTA</u> -----	
	3401	3440
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1779)	----- <u>AATTGTTTATGG</u>	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (2372)	<u>AGACATG</u> <u>TTTATGC</u> <u>GAAACTCATGTGAA</u> <u>AGTC</u> <u>TTGAAAT</u>	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (3048)	<u>AGACATG</u> <u>TTTATGC</u> <u>GAAACTCATGTGAA</u> <u>AGTC</u> <u>TTCAAAT</u>	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (3075)	<u>GATATATTACATTGGTC</u> <u>ATACAACATT</u> <u>AATTATTAATAA</u>	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (3077)	<u>ACTCTATT</u> ----- <u>TAGAG</u> --- <u>AGTTTTTTAG</u>	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (2351)	----- <u>AATTGTTTATAG</u>	
	3441	3480
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1791)	---- <u>TACT</u> -----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (2412)	<u>AATAGA</u> <u>TTTGGTATAAAT</u> <u>ATTCAAA</u> <u>ATTTCCTT</u> -----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (3088)	<u>AAAATA</u> <u>TTTGGTATAAAT</u> <u>TTTC</u> <u>AAATTTC</u> -----	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (3115)	<u>ATTT</u> <u>TACATAG</u> - <u>AAACCG</u> <u>AAACGACATATA</u> <u>ATTGGAA</u>	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (3102)	<u>AGGT</u> <u>TA</u> <u>CGCAGTA</u> <u>ACTC</u> <u>AGAAAATGA</u> -----	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (2363)	---- <u>TACT</u> -----	
	3481	3520
FAD3A (SEQ ID NO:15) (1795)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (2446)	---- <u>AAAATAAATAATT</u> <u>ATATATAA</u> <u>TTAATATAAAT</u> -----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (3121)	---- <u>AAAATAAATAATT</u> <u>ATAAATTAA</u> <u>ATAATATAAAT</u> ---	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (3154)	<u>CAAAAAA</u> <u>TTCTCTAA</u> <u>AACGACTT</u> <u>ATATTAAAAACGGA</u>	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (3128)	---- <u>AAATCTAT</u> ----- <u>ACTTTAT</u> -----	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (2367)	-----	

ФИГ.3V

29/80

ФИГ. 3W	3521	3560
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1795) ----G---TAGTTAACCTTAACAACGGGCCACTTATATT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2473) ----TTGTGATAAAATCTCGTCAAAACACTCACTAATGCAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3153) ----TTGTGATAAAATCTCGTCAAAACACTCACTAATGCAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3194) GGGAGTAGTACCTAACCTTAACGATGGACCACCTTATATT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3145) -----AGTACCTAACCTTATCGATGGACCACCTTATATT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2367) ----G---TAGTTAACCTTAACAACGGACCACCTTATATT	
	3561	3600
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1828) GAGCCATTGG-CATAAAATGATT-CTTCTCGAAATTGGTT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2509) ATGCTTAT-TTGAATTCTTACTCCTCTAAATGCATT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3189) ATGCTTATATTGAGTTCTTACTCCTCTAAATGCATT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3234) GAGTCCTTAG-CATAAAATGATT-CTCCTCGAAATCCGTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3179) GAGTCCTTAG-CATAACATGATT-CTCCTCGAAATCCGTT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2400) GAGCCATTGG-CATAAAATGATT-CTTCTCGAAATTGGTT	
	3601	3640
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1866) TACTTTCT--TAGTATT-TTT-----CAGTTTGCTAG	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2548) TACTTTTAACTAAATTATTATTCTTCTCTAAATTGGCG	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3229) TACTTTTAACTATTATTATTCTTCTCTAAATTGGCTG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3272) TACTTTCTT--CATTATT-TTTCCCTTTCAGTTTGCGC	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3217) TACTTTCTT--CGTTATT-TTTCCCTTTCAGTTTGCGC	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2438) TACTTTCT--TAGTATT-TTT-----CAATTGGAG	
	3641	3680
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1896) TTTACGTAGAACTAAT-----AA-----AAAG-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2588) TTT-CGTAATAGTTG--TCTGTATTTGAAAAACTA----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3269) TTTTGGTAATAGTTG--CCTGTGTTTGAAACATA----	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3309) TTTTGGTAATACTTTGTCTCAATCTGAAAGCTATTAG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3254) TTTTGGTAATACTTTGTCTGCAATCTGAAAGCTATTAG	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2468) TTTACGTAGAACTAAT-----AA-----AAAG-----	

ФИГ.3W

30/80

ФИГ.ЗХ	3681	3720
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1918) -AAAAAAACTTATAAACACACC-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2621) -ACAAAAAAATAATAAAAACAAA-----AGCTTATAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3303) -ACAAAAAAATAATAAAAACAAA-----AGTTTATAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3349) TATAAAAACTTATAAACACATCACATGCAATGAATTATA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	TATAAAAA-CTTATAAACACAT-----GAATTATA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2490) -AAAA---ACTTATAAACACACC-----	
	3721	3760
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1939) -----ACATGCAATGAATA---	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2651) ---ACACAT-----A-GCATGCAATGAATATG-	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3333) ---ACACAT-----A-GCATGCAATGAAT---	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3389) CGAATACATAACCAGAATGACAATTTCATGAAATATT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	CGAATACATAACCAGAATGACAATTTCATGAAATATT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2509) -----ACATGCAATGAATA---	
	3761	3800
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1953) AATTGAAATATATAA---CCATACTGTTAAA-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2674) TACGAATATATAACCAATACATA-TCTAAGTACTATTT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3353) -----ATATATATCAATACATA-TCTAAGTACTATTT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3429) AATACCACTTAAGTACTACTCCGTAATAGTAATAGTAATAG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3363) AATACTAGTAAAGTACTACTCCGTAATAGTAAT-----TAG	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2523) AATTGAAATATATAA---CCATACTGTTAAA-----	
	3801	3840
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1981) ---TATTAAT-----T---AA--	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2713) TCCAAGTACT---T-----AATCTTGATTAC	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3385) TGCAAGTACT---T-----AATCTTGATTAC	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3469) TCATATTAATTTTTTGTCAACAAACAGTAATAG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	TAATAGTAAT-----AGTAATAG	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2551) ---TATTAAT-----T---TA--	

ФИГ.ЗХ

31/80

ФИГ.ЗУ		3841	3880
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(1991)	-CATTTAATCTTAATTTCGCATCCAGTTGCCAGAAAAA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2736)	TAAAATTTCATTTAAATTGTTCCCTTCAGTTACCAAGAAAGG	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3408)	TAAAATTTCATTTAAATTGTTCCCTTCAGTTACCAAGAAAG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3509)	TAATATTAAATTATAATTATGTATTTCAGTTGCCAGAAAAG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3416)	TCATATTAAATTATAATTATGTATTTCAGTTGCCAGAAAAG	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2561)	-CATTTAATCTTAATTTCGCATCCAGTTGCCAGAAAAA	
	3881		3920
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2030)	TTATACAAGAATTGTCCCACAGTACACGGATGCTCAGAT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2776)	TTATACAAGAATTTCACCCACAGTACTCGGATGCTCAGAT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3448)	TTATACAAGAATTTCACCCACAGTACTCGGATGCTCAGAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3549)	TTGTACAAGAACCTTGCCCCATAGTACTCGGATGCTCAGAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3456)	TTGTACAAGAACCTTGCCCCATAGTACTCGGATGCTCAGAT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2600)	TTATACAAGAATTGTCCCACAGTACACGGATGCTCAGAT	
	3921		3960
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2070)	ACACTGTCCCTCTCCCCATGCTCGCTTACCCCTCTCTATCT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2816)	ACACTGTCCCTCTGCCCATGCTCGCTTACCCGATCTATCT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3488)	ACACTGTCCCTCTGCCCATGCTCGCTTACCCGATCTATCT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3589)	ACACTGTCCCTCTGCCCATGCTCGCTTACCCGATCTATCT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3496)	ACACTGTCCCTCTGCCCATGCTCGCTTACCCGATCTATCT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2640)	ACACTGTCCCTCTCCCCATGCTCGCTTACCCCTCTCTATCT	
	3961		4000
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2110)	GGTAAATCCTAATTCCCTCATTTTCCTGATTATAATT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2856)	GGTAT-----TTTTTAATTCTAAATTTTACT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3528)	GGTAT-----TTTTTAATTCTAAACCTTACC	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3629)	GGTAAAAAA-TACAATTCAATTTTCTTAAATT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3536)	GGTAAAAAA-TACAATTCTATTTTT-CTTAAATT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2680)	GGTAAATCCTAATTCCCTCATTTTCCTGATTATAATT	

ФИГ.ЗУ

32/80

ФИГ.3Z		4001	4040
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2150)	ACAATTGAAATTTAGATTTGAGTATTAA--CTAAAT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2883)	ACAAGT----CATTAGAC--TGTGTTTAA--AACAT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3555)	ACAATT----CATTAGAT--TGTGTTTAA--AACAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3668)	ACAAAT----GGTTTATAATTTGAGTTAAAGCCAATAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3573)	ACAAAT----GATTTTATAATTTGAGTTAAAGCCAATAT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2720)	ACAATTGAAATTTAGATTTGAGTATTAA--CTAAAT	
	4041		4080
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2188)	ATAAATTAAATTGTTGGGATGA-CTACAGTGGTACAG	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2915)	ATAA-TTATTTTG-TTTCGTTTA-CTGCAGTGGTACAG	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3587)	ATAAATTATTTCTTTGGTTTA-CTGCAGTGGTACAG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3704)	ATAAATTAAATTGATTGGATTAACTACAGTGGTACAG	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3609)	ATAAATTAAATTGATTGGATTAACTACAGTGGTACAG	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2758)	ATAAATTAAATTGTTGGGATGA-CTACAGTGGTACAG	
	4081		4120
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2227)	AAGTCCTGGTAAAGAAGGGTCACATTATAACCCATACAGT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2952)	AAGTCCTGGAAAAGAAGGGTCACATTATAACCCATACAGT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3626)	AAGTCCTGGAAAAGAAGGGTCACATTATAACCCATACAGT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3744)	AAGTCCTGGAAAAGAAGGGTCACATTATAACCCATACAGT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3649)	AAGTCCTGGAAAAGAAGGGTCACATTATAACCCATACAGT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2797)	AAGTCCTGGTAAAGAAGGGTCACATTATAACCCATACAGT	
	4121		4160
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2267)	AGTTTATTTGCCCCAAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(2992)	GGTTTATTTGCTCCAAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3666)	GGTTTATTTGCTCCAAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3784)	AGTTTATTTGCTCCAAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3689)	AGTTTATTTGCTCCAAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2837)	AGTTTATTTGCCCCAAGCGAGAGAAAGCTTATTGCAACTT	

ФИГ.3Z

33/80

ФИГ. ЗА'		4161	4200
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2307)	<u>CAACTACTTGCTGGTCGATCATGTTGGCCACTCTTGT</u> TA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3032)	<u>CGACTACTTGCTGGCCATAATGTTGGCAATTCTTA</u> CTG	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3706)	<u>CAACTACTTGCTGGTCATAATGTTGGCCATTCTTAT</u> CTG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3824)	<u>CAACAACTTGCTGGCCATAATGTTGGCAACTCTTGT</u> TA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3729)	<u>CAACTACTTGCTGGTCATAATGTTGGCCACTCTTGT</u> TA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2877)	<u>CAACTACTTGCTGGTCGATCGTGGTGGCCACTCTTGT</u> TA	
	4201		4240
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2347)	<u>TCTATCATTCCCTCGTTGGTCCAGTCACAGTTCTAAAGTC</u>	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3072)	<u>TCTTTCCTTCCTCGTTGGTCCAGTCACAGTTCTAAAGTA</u>	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3746)	<u>TCTTTCCTTCCTCGTTGGTCCAGTCACAGTTCTAAAGTA</u>	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3864)	<u>TCTATCGTTCCTCGTTGGTCCAGTCACAGTTCTAAAGTC</u>	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3769)	<u>TCTATCGTTCCTCGTTGATCCAGTCACAGTTCTAAAGTC</u>	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2917)	<u>TCTATCATTCCCTCGTTGGTCCAGTCACAGTTCTAAAGTC</u>	
	4241		4280
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2387)	<u>TATGGTGTTCCTTACATTGTAAGTTTCATA-TATTC</u> ---	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3112)	<u>TACGGTGTTCCTTACATTGTAAGTTCTTAGTATATCATA</u>	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3786)	<u>TACGGTGTTCCTTACATCGTAAGTTCTTAGTATATCATA</u>	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3904)	<u>TATGGTGTTCCTTACATTGTAAGTTTCACA-TATTATTAC</u>	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3809)	<u>TATGGGCGTTCCTTACATTGTAAGTTTCACA-TATTATTAC</u>	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2957)	<u>TATGGTGTTCCTTACATTGTAAGTTTCATA-TATTC</u> ---	
	4281		4320
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2423)	-----ATTATTATATCATTGCTAATATA-----AT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3152)	<u>AAGGGTATATATTATTATTCAATATAATATACTATATGAT</u>	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3826)	<u>AAGGGTATATATTATTATTCAATATAATATACTATATGAT</u>	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3943)	<u>AAGAG-ATTTATATATTATTAAATAATAAA-----TT</u>	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3848)	<u>AAGAA-ATTTATATATTATTAAATAATAAA-----TT</u>	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(2993)	-----TTTATTATATCATTGCTAATATA-----AT	

ФИГ.ЗА'

34/80

ФИГ. 3В'		4321	4360
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2448)	TTGTTTTGACATAAA-GTTTGGAAAAATTTCAGATCTT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3192)	TTGTTTTGTCATATA-TTTTG--AAATATTCAAGATCTT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3866)	TTGTTTTGTCATAAA-CTTTG--AAAT--TCAGATCTT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(3973)	TGTTTTGACATAAA-GTTTGGAAATTTCAGATCTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3878)	TGTTTTGACATAAG-GGTTTGGAAATTTCAGATCTT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3018)	TTGTTTTGACATAAAAGTTTGGAAATTTCAGATCTT	
		4361	4400
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2487)	TGTAATGTGGTGGACGCTGTCACGTACTTGCATCATCAT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3229)	TGTGATGTGGTGGACGCTGTCACTTACATTGCATCACCAT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3901)	TGTGATGTGGTGGACGCTGTCACTTACATTGCATCACCAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4012)	TGTAATGTGGTGGACGCTGTCACGTACTTGCATCATCAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3917)	TGTGATGTGGTGGACGCTGTCACGTACTTGCATCATCAT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3058)	TGTAATGTGGTGGACGCTGTCACGTACTTGCATCATCAT	
		4401	4440
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2527)	GGTCACCGATGATAAGTTGCCTTGGTACAGAGGCAAGGTAA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3269)	GGTCATGATGAGAACGTTGCCTTGGTACAGAGGCAAGGTAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3941)	GGTCATGATGAGAACGTTGCCTTGGTACAGAGGCAAGGTAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4052)	GGTCACCGATGAGAACGTTGCCTTGGTACAGAGGCAAGGTAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3957)	GGTCACCGATGAGAACGTTGCCTTGGTACAGAGGCAAGGTAA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3098)	GGTCACCGATGATAAGCTGCCTTGGTACAGAGGCAAGGTAA	
		4441	4480
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2567)	GTAGATCAACATT-----AATTTATAA-----G	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3309)	TTAAATTAACTATTACAA--GTATTTTAC-----A	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(3981)	TTAAATTAACTCCTAGGT--GATTTCCCGTGCTCATGTA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4092)	ATAAATCAATTAAAAGAAATGACAG-----A	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(3997)	TTAAATCAATTAAAAGAAATGACAG-----A	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3138)	GTAGATCAACATT-----A-TTTATAA-----G	

ФИГ.3В'

35/80

ФИГ. 3С'		4481	4520
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2590)	AAGCAACAATGATTAGTAT-TTGATTAATCTA-AATTATT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3337)	AAAAACTAATGATTAGTATATTGATTAATCTTAATTCTT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4019)	CGGATATAAAATATTCTAAAGTAAATATACTATAATAATT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4123)	AAGCAATAATGGTTAGTA--TTGATTAATCTT-AATTTT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4028)	AAGCAATAATGGTTAGTA--TTGATTAATCTT-AATTTT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3160)	AAGCAATAATGATTAGTAG-TTGAATAATCTG-AATTTT	
	4521		4560
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2628)	GATGTTTGTGTACAATAATAGGAATGGAGTTATTTACGT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3377)	GATGTTTGTGATTAAATAATAGGAATGGAGTTACGT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4059)	AATTGTTATTATTAAATTAAATTAGTTATAATT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4160)	GATGTTTGCATAACAATAATAGGAATGGAGTTATTTACGT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4065)	GATGTTTGCATAACAATAATAGGAATGGAGTTATTTACGT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3198)	GATGTTT-TGTACAATAATAGGAATGGAGTTATTTACGT	
	4561		4600
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2668)	GGAGGATTAACAACTATTGATAGAG-----ATTACGG-GA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3417)	GGAGGATTAACAACTATTGATAGAG-----ATTACGG-AA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4099)	GTATGCATGATTAATTAATAAAATTATATTACTTTAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4200)	GGAGGATTAACAACTATTGATAGAG-----ATTACGG-AA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4105)	GGAGGATTAACAACTATTGATAGAG-----ATTACGG-AA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3237)	GGAGGATTAACAACTGTTGATAGAG-----ATTACGG-GA	
	4601		4640
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2702)	TCTTCACAAACATTCATCACGATATTGAACTCACGTGAT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3451)	TTTTCAACAAACATTCATCACGACATTGAACTCACGTGAT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4139)	TTATAAAATATGATT-TATATATGTTATATCTAATCGTT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4234)	TCTTCACAAACATCCATCACGACATTGAACTCACGTGAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4139)	TCTTCACAAACATCCATCACGACATTGAACTCACGTGAT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3271)	TCTTCACAAACATTCATCACGATATTGAACTCACGTGAT	

ФИГ.3С'

36/80

ФИГ. 3Д'		4641		4680
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2742)	CCATCATCTTTCCACAAATCCCTCACTATCACTTGGTT		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3491)	CCATCATCTTTCCACAAATCCCTCACTATCACTTGGTC		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4178)	TTGTTGTCTTACAGTCAGTTAGT---TATCATTTGGGT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4274)	CCATCATCTTTCCACAAATCCCTCACTATCACTTGGTC		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4179)	CCATCATCTTTCCACAAATCCCTCACTATCACTTGGTC		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3311)	CCATCATCTTTCCACAAATCCCTCACTATCACTTGGTC		
		4681		4720
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2782)	GATGCCGTGAGTGATCTCGCT---CTCTCTC---TAGTT		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3531)	GATGCTGTGAGTCATCTCACTCTCTGGCTAC-----TTT		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4215)	-AAATTGGATTGCATCTCAGAATTCAACTGTAAATATT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4314)	GATGCCGTGAGTGATCTAGCTTCTCTCTCTC---TAGTT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4219)	GATGCCGTGAGTGATCTAGCTTCTCTCTC---TAGTT		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3351)	GATGCCGTGAGTGATCTCGCT---CTCTCTC---TAGTT		
		4721		4760
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2815)	TCATTTGATTAAAA---TAAAGGTGATTAATTACTAAT		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3565)	CATCAAAACCATTGATTAAAGGGTGATTAATTACTAATG		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4254)	TATTTTAACCTATAT---TAAATTGATTAATTCTTCTATT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4351)	TCATTTGATTAAA-----TG-GTGATTAATTACTAATT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4256)	TCATTTGATTAAA-----TG-GTGATTAATTACTAATT		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3384)	TCATTTGATTATA---TAAAGGTGATTAATTACTAAT		
		4761		4800
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2853)	TAGTGATCTTAATTAAATGATATGCG-ACAGACGAATCAG		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3605)	TAGTGATTTA-ACAAATGGAATGTGACAGACAAAGCAG		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4292)	T--TCATTT----AGGTGGTTGTGCTTAACTT---		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4383)	TA-----A-TTAATGAATTGGACAGACGAGGCAG		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4288)	TA-----A-TTAATGAATTGGACAGACGAGGCAG		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3421)	TAGTGATCTTAATTAAATGACATGCG-ACAGACGAAGCAG		

ФИГ.3Д'

37/80

ФИГ. ЗЕ'		4801		4840
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2892)	CTAAACATGTGTTGGAAAGATACTACAGAGAACCAAGAC		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3644)	CTAAACATGTGTTGGAAAGATACTACAGAGAACCAAGAC		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4322)	-TAAATATATTTTATAAAGATTATGTATAACTTAATAT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4414)	CTAAACATGTGTTAGGAAGATACTACAGAGGCCGAAGAC		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4319)	CTAAACATGTGTTAGGAAGATACTACAGAGGCCGAAGAC		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3460)	CTAAACATGTGTTGGAAAGATACTACAGAGAACCAAGAC		
	4841		4880	
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2932)	GTCAGGAGC---AAT--ACCGATCCACTTGGTGGAAAGT		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3684)	GTCAGGAGC---AAT--ACCGATCCACTTGGTGGAGAGT		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4361)	AATTCTGCTTAAATGAAATAAAAAATAAAATAAGTGT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4454)	GTCAGGAGC---AAT--ACCGATTCACTTGGTGGAGAGT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4359)	GTCAGGAGC---AAT--ACCGATTCACTTGGTGGAGAGT		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3500)	GTCAGGAGC---AAT--ACCGATCCACTTAGTGGAAAGT		
	4881		4920	
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(2966)	TTGGTGCAGTATTAAAGAAAGATCATACGTCAAGTGACA		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3718)	TTGGTCAAGTATTAAAGAAAGATCATACGTCAAGTGACA		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4401)	CTGATTCTAAATTACATAAATTATAACGATAAT-ATT		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4488)	TTGGTCGCAAGTATTAAAAAGATCATACGTCAAGTGACA		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4393)	TTGGTCGCAAGTATTAAAAAGATCATACGTCAAGTGACA		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3534)	TTGGTGCAGTATTAAAGAAAGATCATACGTCAAGTGACA		
	4921		4960	
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3006)	CTG--GTGATATTGTCTTCTACG---AGACAGATCCAGAT		
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3758)	CTG--GTGACATTGTCTTCTACG---AGACTGATCCAGAT		
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4440)	CTGAAGCTCATGCATAATATATATAAATTTCACAAAAG		
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4528)	CTG--GTGATATTGTCTTCTACG---AGACAGATCCAGAT		
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4433)	CTG--GTGATATTGTCTTCTACG---AGACAGATCCAGAT		
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3574)	CTG--GTGATATTGTCTTCTACG---AGACAGATCCAGAT		

ФИГ.ЗЕ'

38/80

ФИГ. 3F'		4961	5000
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3041)	CTCTACGTT-TATGCTTCTGACAA-ATCCAAAATCAACTA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3793)	CTCTACGTT-TATGCTTCTGTCAA-ATCGAAAATCAATTAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4480)	AACTAAATTGTAACATTGGTTAATATTTCAGTAATTAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4563)	CTCTACGTT-TATGCTTCGGACAA-ATCTAAAATCAATTAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4468)	CTCTACGTT-TATGCTTCTGACAA-ATCTAAAATCAATTAA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3609)	CTCTACGTT-TATGCTTCTGACAA-ATCCAAAATCAATTAA	
		5001	5040
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3079)	ACCTTTCTTCCTAGCTCTATTTAG-----GAATAA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3831)	AACTTTCTTCCTCCCTTTGTTAGCACTATTATGAATAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4520)	AAATATTTTATAAAATTCTAAATA---ACT-TTATGTTATT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4601)	ACTTTTCTTCCTAGCTCTATT-AG-----GAATAA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4506)	ACTTTTCTTCCTAGCTCTATT-AG-----GAATAA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3647)	ATCTTTCTTCCTAGCTCTATTTAG-----GAATAA	
		5041	5080
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3109)	AACAGTCCTTGTTGGTTTACTTATTCTGGTTGTTTTAA	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3871)	A--CCAGTTTTTTT---ACTTATAATTGTTGTTTTAA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4556)	A--ATTATTGAATGAAACTGAAATTATTAAATTAAAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4630)	A-CACTCCTCTCTTT-ACTTATTGTTCTGCTTT-AA	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4535)	A-CACTCCTCTCTTT-ACTTATTGTTCTGCTTT-AA	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3677)	AACACTCCTTGTTGGTTT-ACTTATTCTGGTTGTTTTAA	
		5081	5120
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3149)	GTTAAA--TGTACTCGTGAAACTTTTTTA-ATTAAATGT	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3906)	GTTAAAATGTACTCGTGAAACTCTTCTTAATTAGATAT	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4594)	CTTAAAAATGAAAACATATTGCTTTGGTATTGGCTTAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4667)	GTTTAAAATGTACTCGTGAAACCTTTT---TATTAATGT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4572)	GTTTAAAATGTACTCGTGAAACCTTTTTT-TATTAATGT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3716)	GTTAAAATGTACTCGTGAAACTTTTTT-ATTAAATGT	

ФИГ.3F'

39/80

ФИГ. 3G'		
	5121	5160
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3186) ATTTACATT-----ACAAATC----AAGTTTTGTCG	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3946) TATTCGATT-----TACA--CTGAAAAACATACAAATTTC	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4634) GGTTCCATTAAAGTTCTACAAACATAAAAACATAACATA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4704) ATTTACGTT-----ACAAAAAGTGGAAAGTTT-GTTAT	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4611) ATTTACGTT-----ACAAAAAGTGGAAAGTTT-GTTAT	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3755) ATTTACATT-----ACAAATCGTAAAGTTTGTCG	
	5161	5200
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3215) TTTTCCTTATGTTTAGTTACAA---TA---AATAAAG-	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(3978) AAAGGT-TGAAAAGAAAGACAAAATTCT--AGAATGA	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4674) AAAACTGTGATTATTTGTAACATTGATCAAACAATGA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4736) CTTTTCTCTAGTTGCAATCAAAGG-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4643) CTTTTCTCTGGTTGCAATCAAAGG-----	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3788) TTTTCCTATGTTTTAGTTACAAACTTAC--AATCAAA	
	5201	5240
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248) -----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4014) C-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4714) TTATTTTTAATTTAATTTAGTTTTAATAACTCTTA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762) -----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669) -----	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3826) AG-----	
	5241	5280
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248) -----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4015) -----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4754) AAAATAAGCAGTGAACAAAGTGAGATTGTATTGAAATT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762) -----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669) -----	
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3828) -----	

ФИГ.3G'

40/80

ФИГ. ЗН'	5281	5320
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248)	-----
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4015)	-----
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4794)	AATATTATAACAAGTAAAATATAATTTTTAAGTTATAAA
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762)	-----
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669)	-----
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3828)	-----
		5321
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248)	-----
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4015)	-----
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4834)	AAAATTCCCTTTTATTATATGTATATGTTTTGGAAAA
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762)	-----
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669)	-----
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3828)	-----
		5360
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248)	-----
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4015)	-----
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4874)	TTTTAAAAGGAAACTAAATAAAAAATAATAATAGTAT
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762)	-----
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669)	-----
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3828)	-----
		5361
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248)	-----
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4015)	-----
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4914)	TTTAAATGTAATATTAAATTCAAGTGTATTAGTGT
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762)	-----
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669)	-----
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3828)	-----
		5400
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248)	-----
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4015)	-----
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(4914)	TTTAAATGTAATATTAAATTCAAGTGTATTAGTGT
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762)	-----
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669)	-----
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3828)	-----
		5440

ФИГ.ЗН'

41/80

ФИГ.3I'	5441	5480
FAD3A (SEQ ID NO:15) (3248)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (4015)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (4954)	AATCAACTATCGTGAGAGTTAACGTGAGAGCGATACATAG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (4762)	-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (4669)	-----	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (3828)	-----	
	5481	5520
FAD3A (SEQ ID NO:15) (3248)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (4015)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (4994)	AAAACCGACTCTCAAATAATTTATAGAGATTACGAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (4762)	-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (4669)	-----	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (3828)	-----	
	5521	5560
FAD3A (SEQ ID NO:15) (3248)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (4015)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (5034)	GTTTCACAAAAAAATTATTAGTATTTGATTAATCTTAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (4762)	-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (4669)	-----	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (3828)	-----	
	5561	5600
FAD3A (SEQ ID NO:15) (3248)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (4015)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (5074)	TTCTTGATGTTTGTGATTAATAATAGGAATGGAGTTACT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (4762)	-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (4669)	-----	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (3828)	-----	

ФИГ.3I'

42/80

ФИГ.3J'	5601	5640
FAD3A (SEQ ID NO:15) (3248)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (4015)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (5114)	TACGTGGAGGATTAACAACATTGATAGAGATTACGGAAT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (4762)	-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (4669)	-----	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (3828)	-----	
	5641	5680
FAD3A (SEQ ID NO:15) (3248)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (4015)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (5154)	TTTCAACAAACATTCATCACGACATTGAACTCACGTGATC	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (4762)	-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (4669)	-----	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (3828)	-----	
	5681	5720
FAD3A (SEQ ID NO:15) (3248)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (4015)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (5194)	CATCATCTTTCCCACAAATCCCTCACTATCACTGGTCG	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (4762)	-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (4669)	-----	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (3828)	-----	
	5721	5760
FAD3A (SEQ ID NO:15) (3248)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (4015)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (5234)	ATGCTGTGAGTCATCTCACTCTCGCTACTTCATCTAA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (4762)	-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (4669)	-----	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (3828)	-----	

ФИГ.3J'

43/80

ФИГ.ЗК'	5761	5800
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248)	-----
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4015)	-----
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(5274)	ACCATTCATTAAAGGGTGATTAATTACTAATGTACTGAT
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762)	-----
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669)	-----
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3828)	-----
		5801
		5840
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248)	-----
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4015)	-----
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(5314)	TTTAACAAATGGAATGTGACAGACAAAAGCAGCTAACAT
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762)	-----
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669)	-----
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3828)	-----
		5841
		5880
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248)	-----
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4015)	-----
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(5354)	GCGTTGGAAAGATACTACAGAGAACCGAAGACGTCAGGAG
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762)	-----
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669)	-----
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3828)	-----
		5881
		5920
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248)	-----
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4015)	-----
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(5394)	CAATACCGATCCACTTGGTGGAGAGTTGGTAGCAAGTAT
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762)	-----
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669)	-----
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3828)	-----

ФИГ.ЗК'

44/80

ФИГ.3Л'	5921	5960
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248)	-----
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4015)	-----
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(5434)	TAAGAAAGATCATTACGTCAGTGACACCGGTGACATTGTC
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762)	-----
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669)	-----
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3828)	-----
		5961
		6000
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248)	-----
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4015)	-----
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(5474)	TTCTACGAGACTGATCCAGATCTCTACGTTATGCTTCTG
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762)	-----
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669)	-----
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3828)	-----
		6001
		6040
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248)	-----
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4015)	-----
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(5514)	TCAAATCGAAAATCAATTAAACTTCTTCCCCCTTTGT
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762)	-----
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669)	-----
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3828)	-----
		6041
		6080
FAD3A (SEQ ID NO:15)	(3248)	-----
FAD3A' (SEQ ID NO:16)	(4015)	-----
FAD3C' (SEQ ID NO:20)	(5554)	TTAGCCCTATTATGAATAAACCAAGTCTTTTCACTTATT
FAD3A'' (SEQ ID NO:17)	(4762)	-----
FAD3C'' (SEQ ID NO:19)	(4669)	-----
FAD3C (SEQ ID NO:18)	(3828)	-----

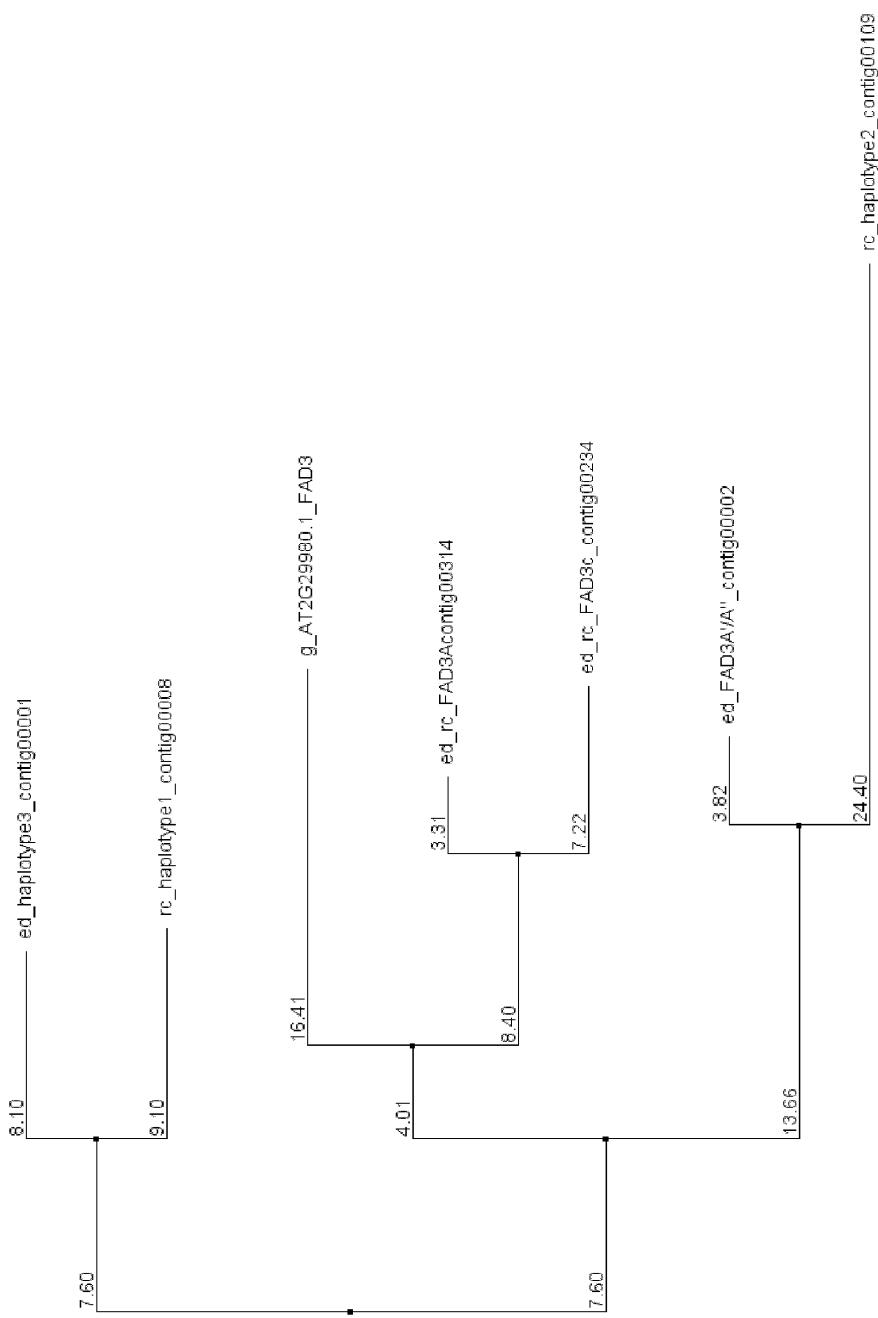
ФИГ.3Л'

45/80

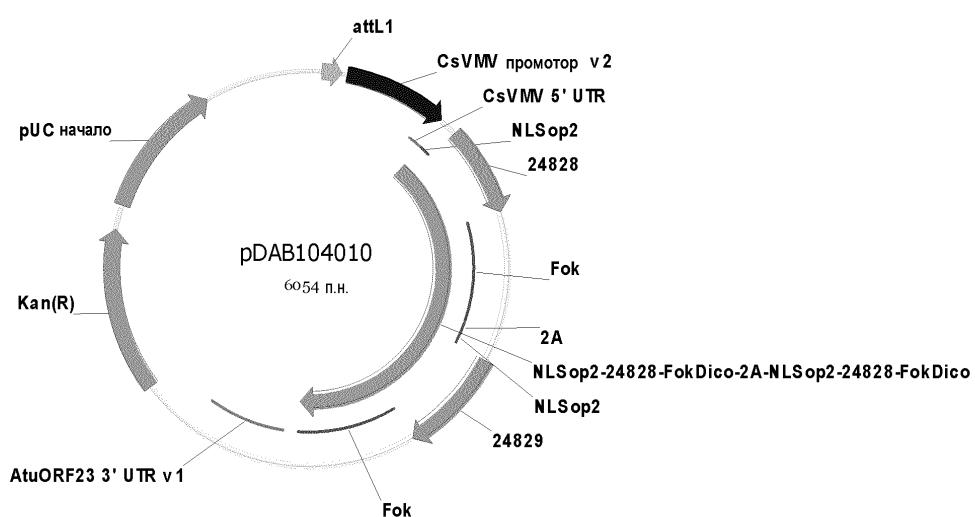
ФИГ. 3М'	6081	6120
FAD3A (SEQ ID NO:15) (3248)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (4015)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (5594)	TATTGGTGTAAAAAGTTAAAGTAAAAATGTAACCGTGAAACTCT	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (4762)	-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (4669)	-----	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (3828)	-----	
	6121	6160
FAD3A (SEQ ID NO:15) (3248)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (4015)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (5634)	TCTTTATTATTAATCCATTATACACTGAAAAACATACA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (4762)	-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (4669)	-----	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (3828)	-----	
	6161	6200
FAD3A (SEQ ID NO:15) (3248)	-----	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (4015)	-----	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (5674)	ATTCAAAGGTTAAAAAGAAAAATAAATTTCTAGACTGA	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (4762)	-----	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (4669)	-----	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (3828)	-----	
	6201	
FAD3A (SEQ ID NO:15) (3248)	-	
FAD3A' (SEQ ID NO:16) (4015)	-	
FAD3C' (SEQ ID NO:20) (5714)	C	
FAD3A'' (SEQ ID NO:17) (4762)	-	
FAD3C'' (SEQ ID NO:19) (4669)	-	
FAD3C (SEQ ID NO:18) (3828)	-	

ФИГ.3М'

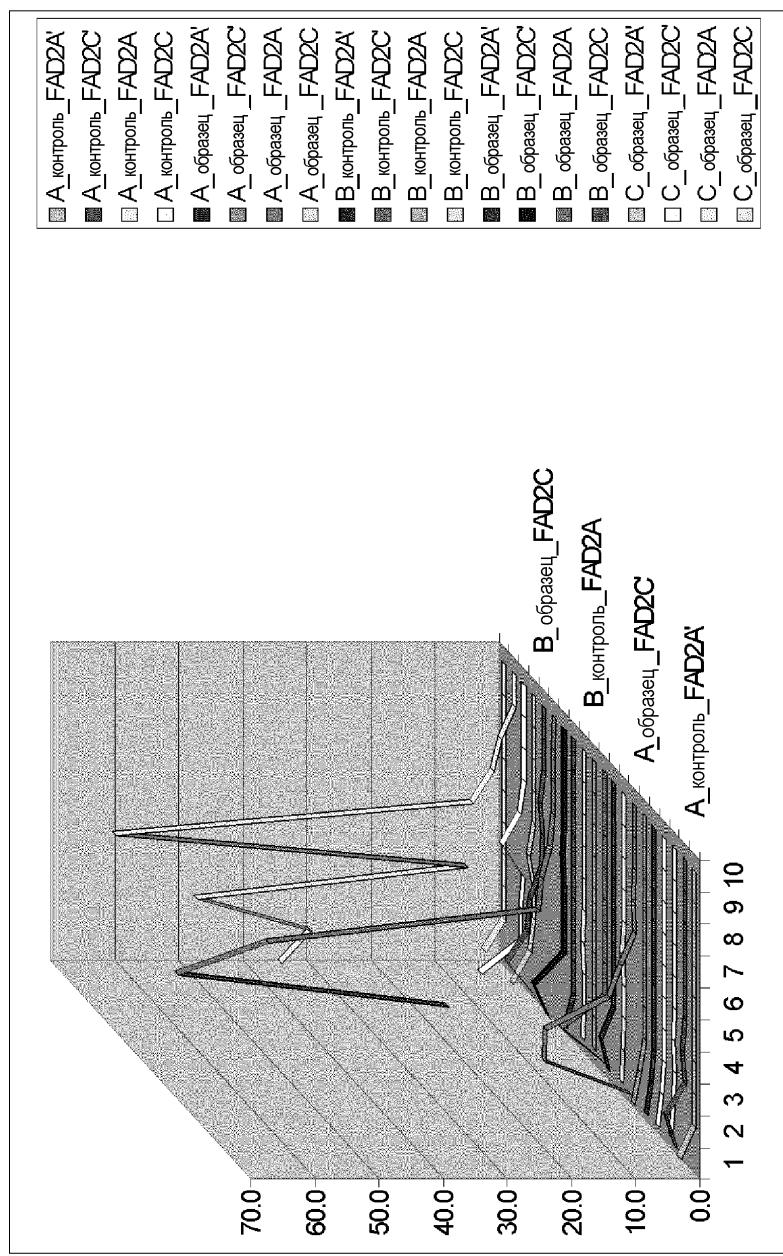
ФИГ.4



ФИГ.5

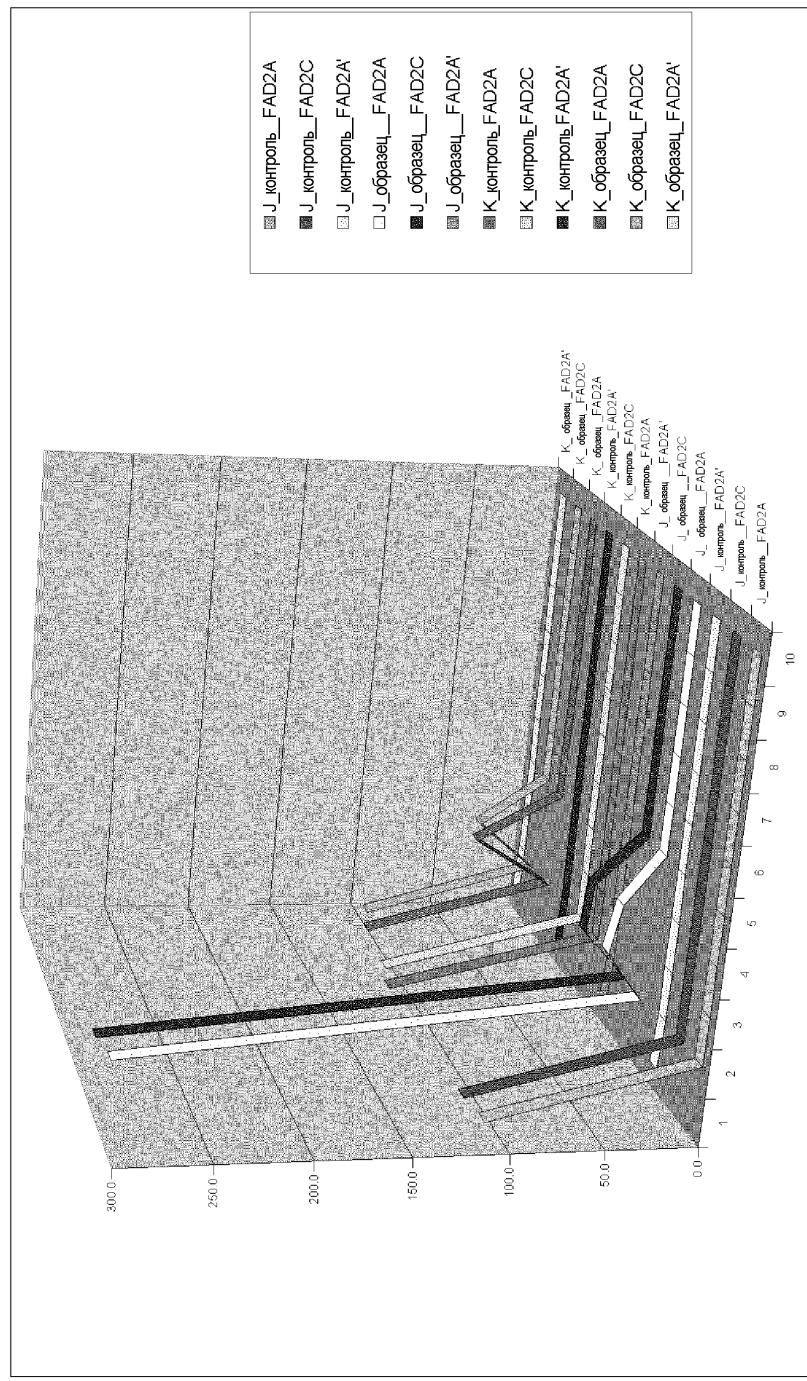


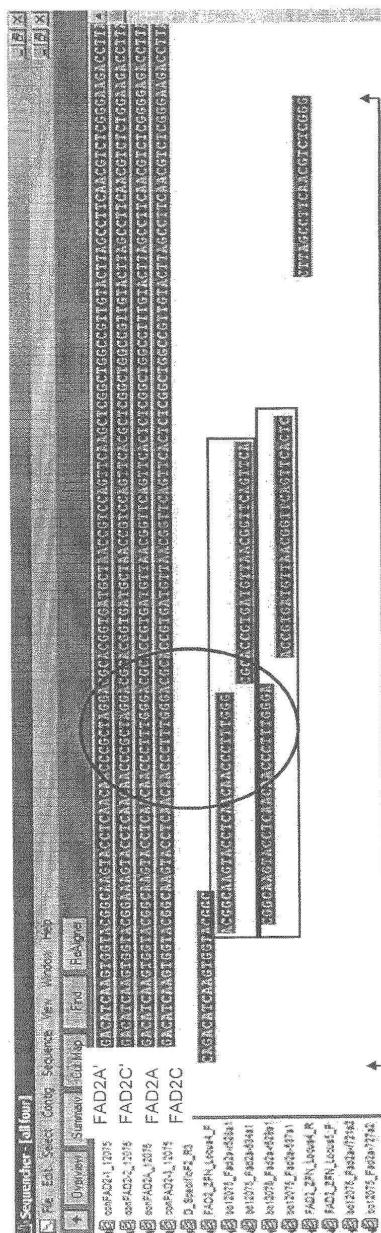
ФИГ.6



49/80

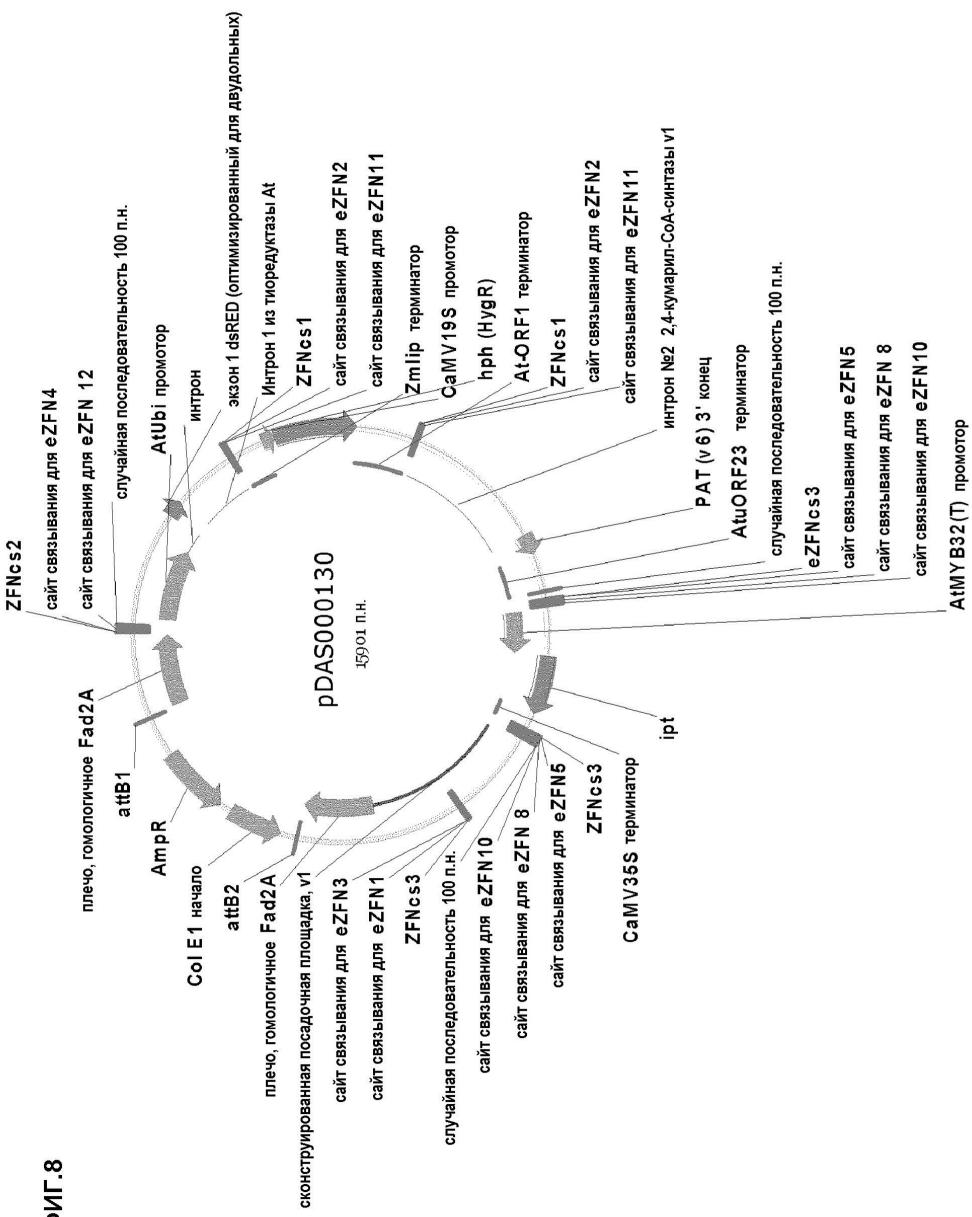
ФИГ.7А



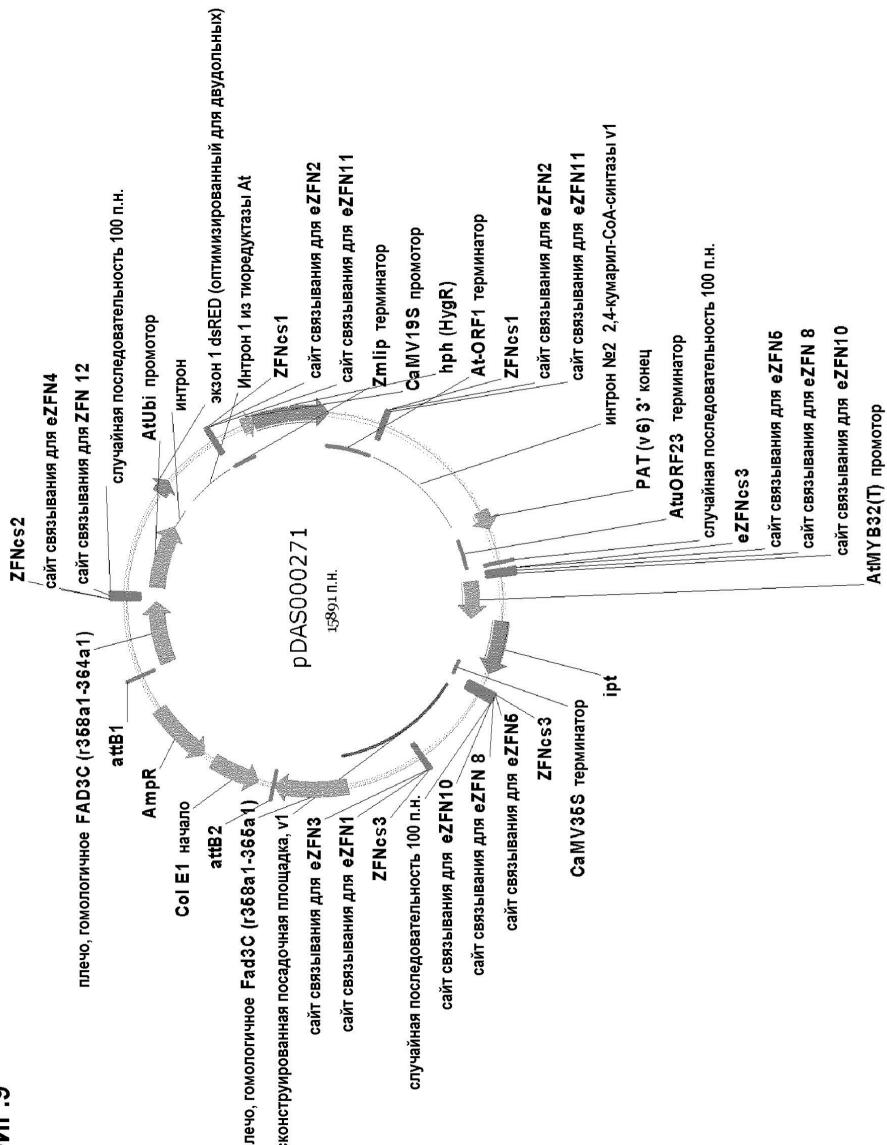


ФИГ. 7 В

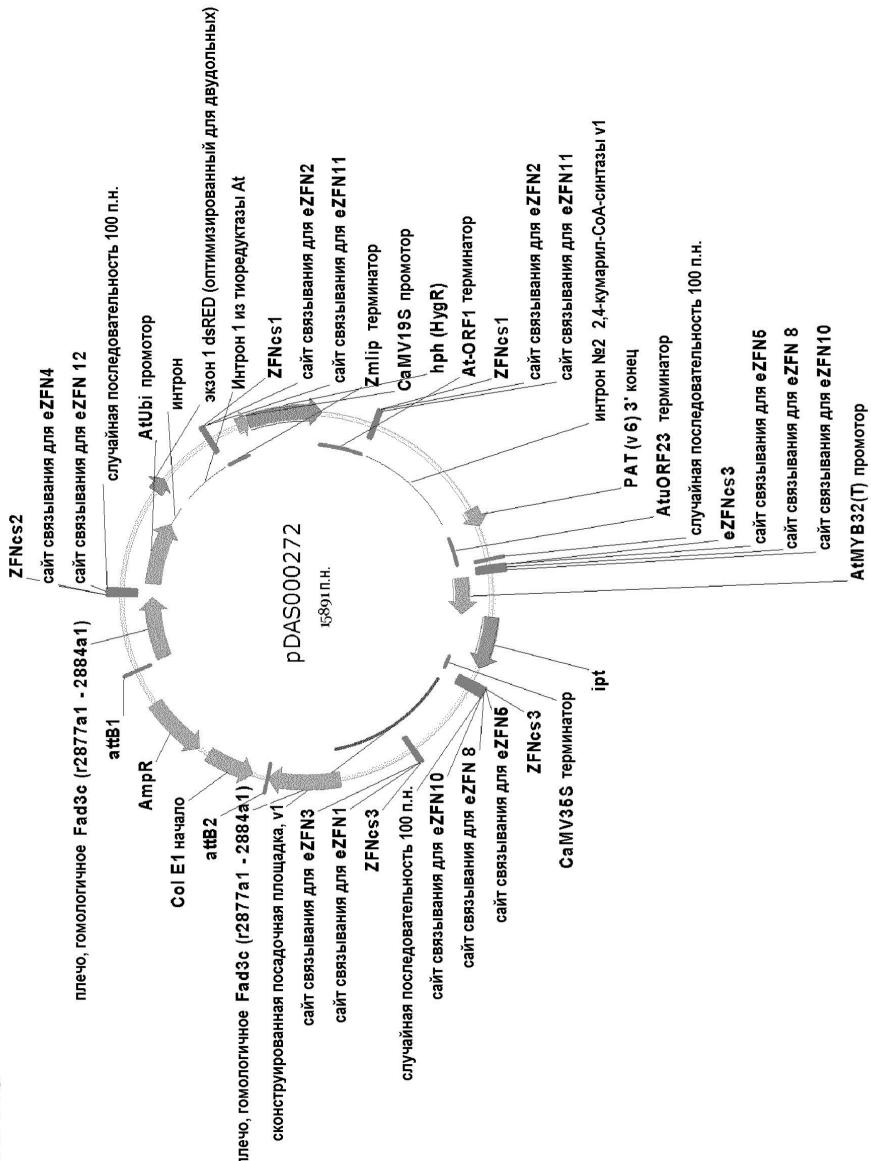
ФИГ. 8



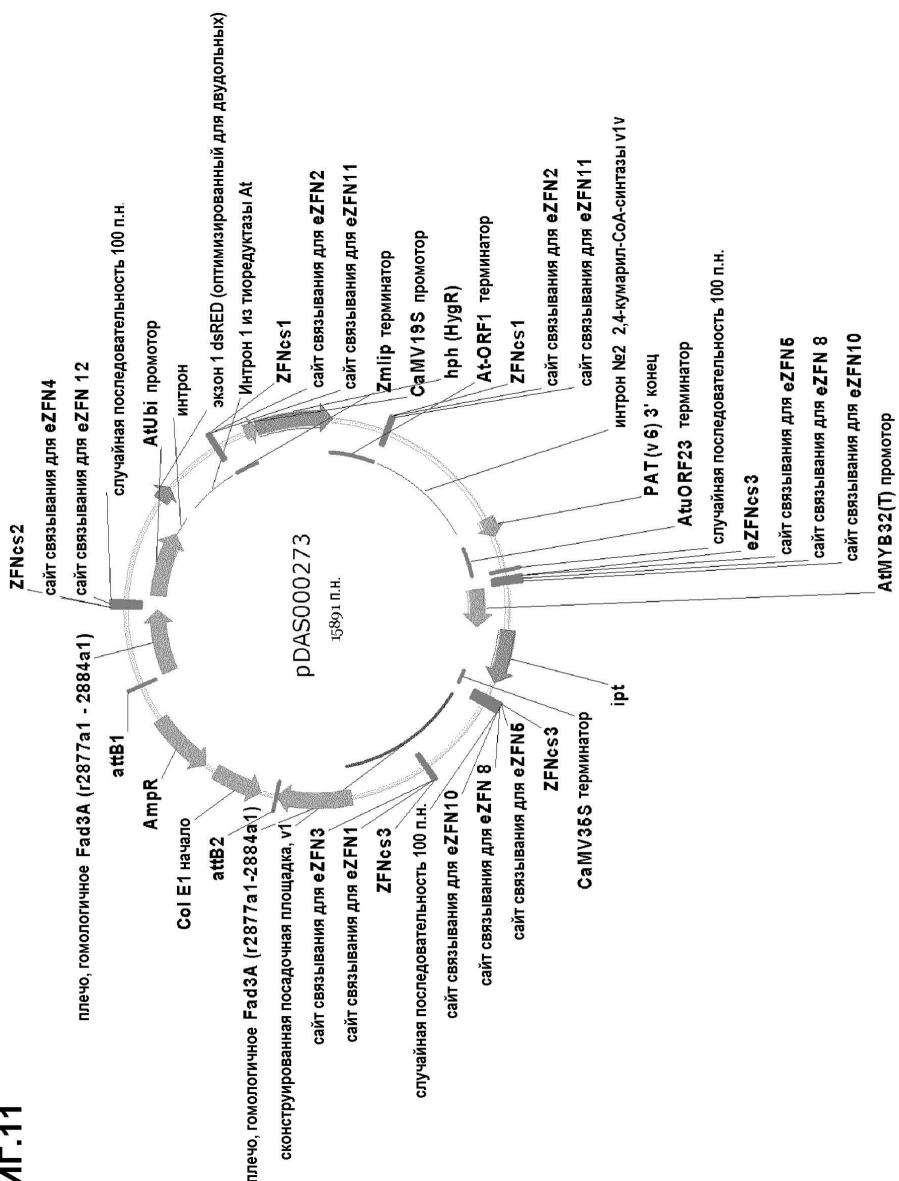
ФИГ.9



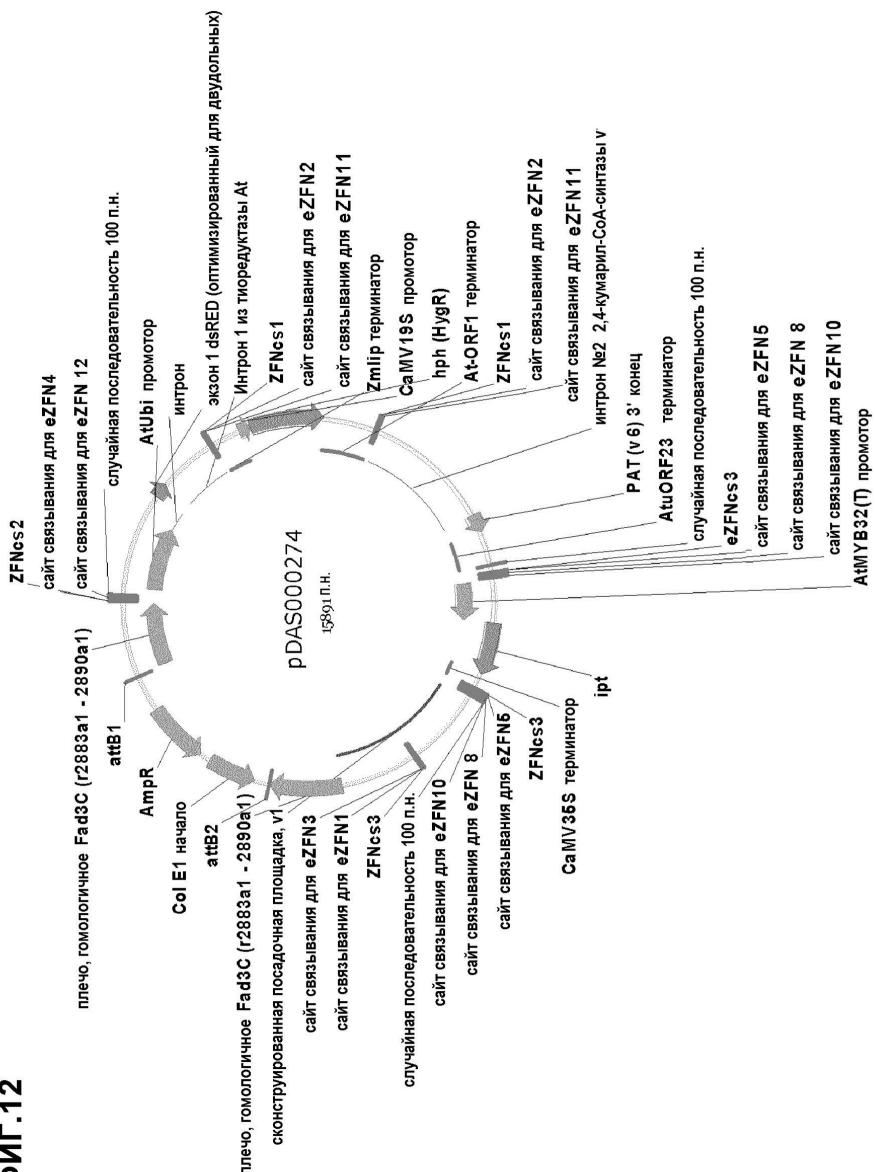
ФИГ. 10

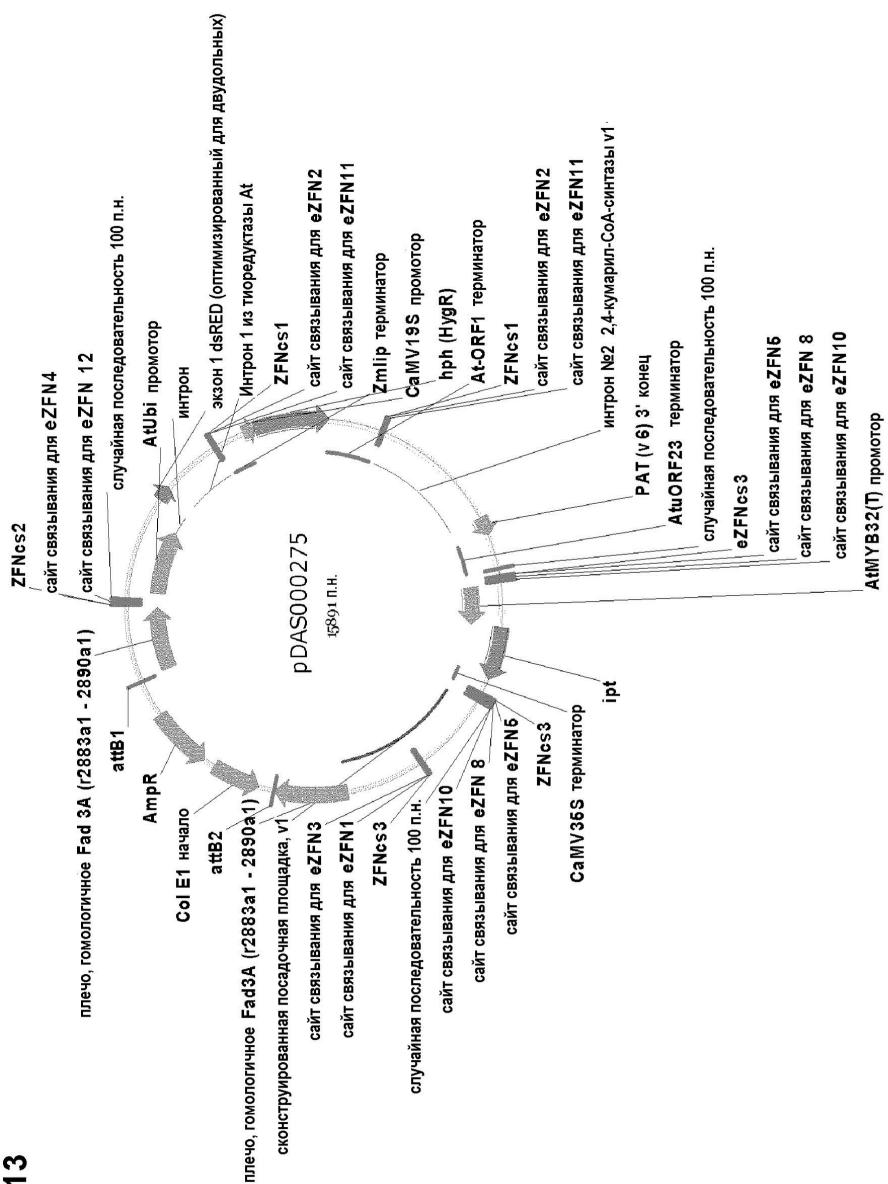


ФИГ. 11

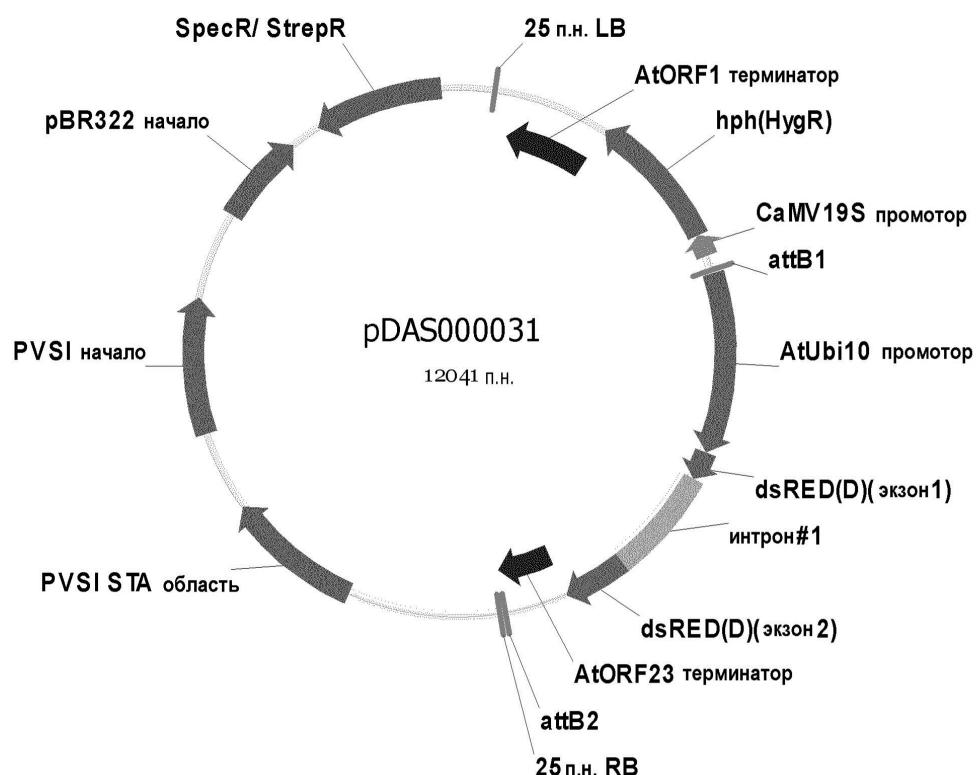


ФИГ. 12

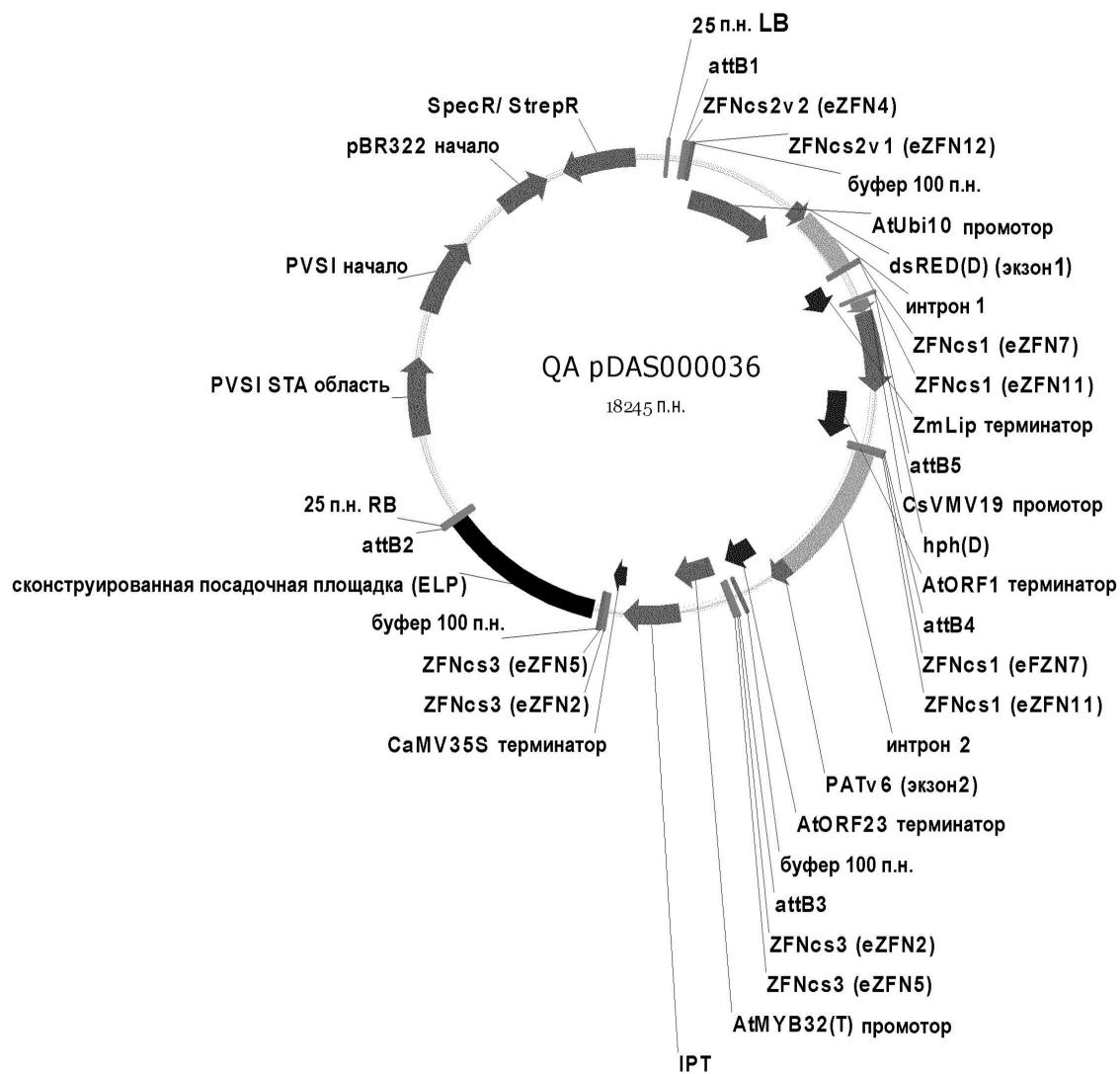


ФИГ.13

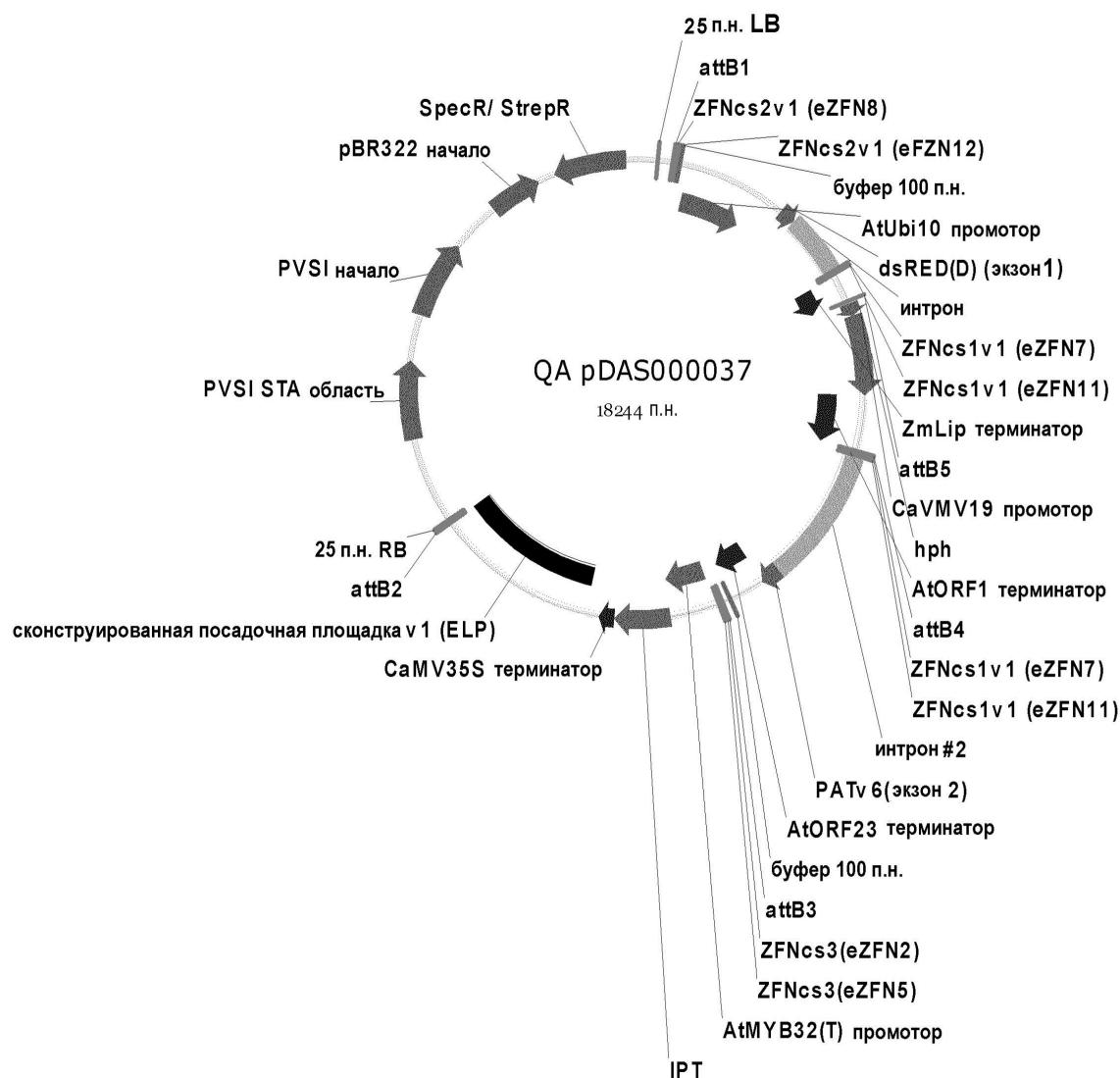
ФИГ.14

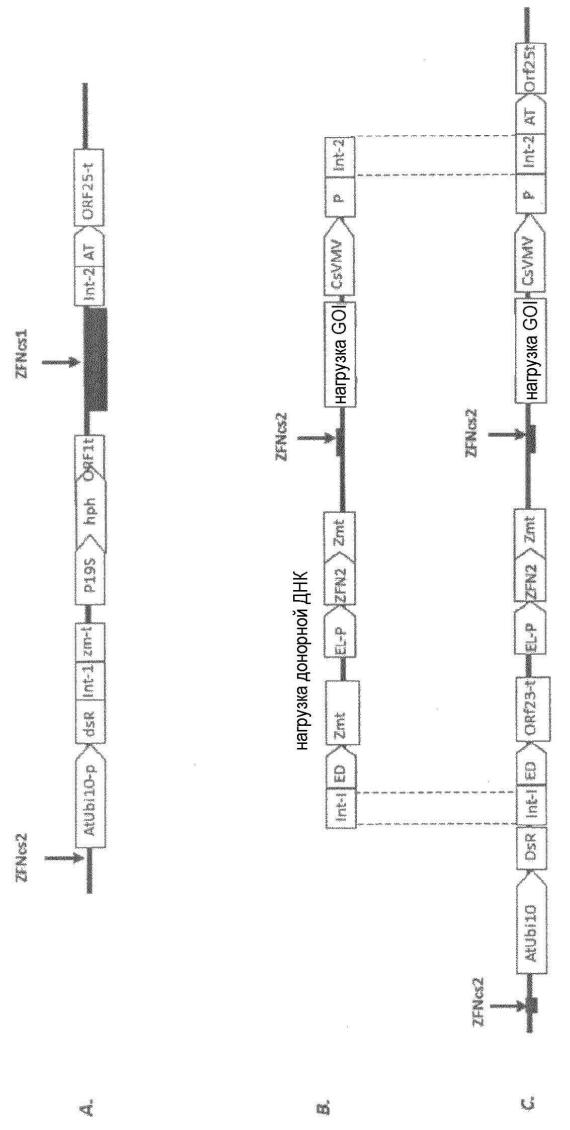


ФИГ.15

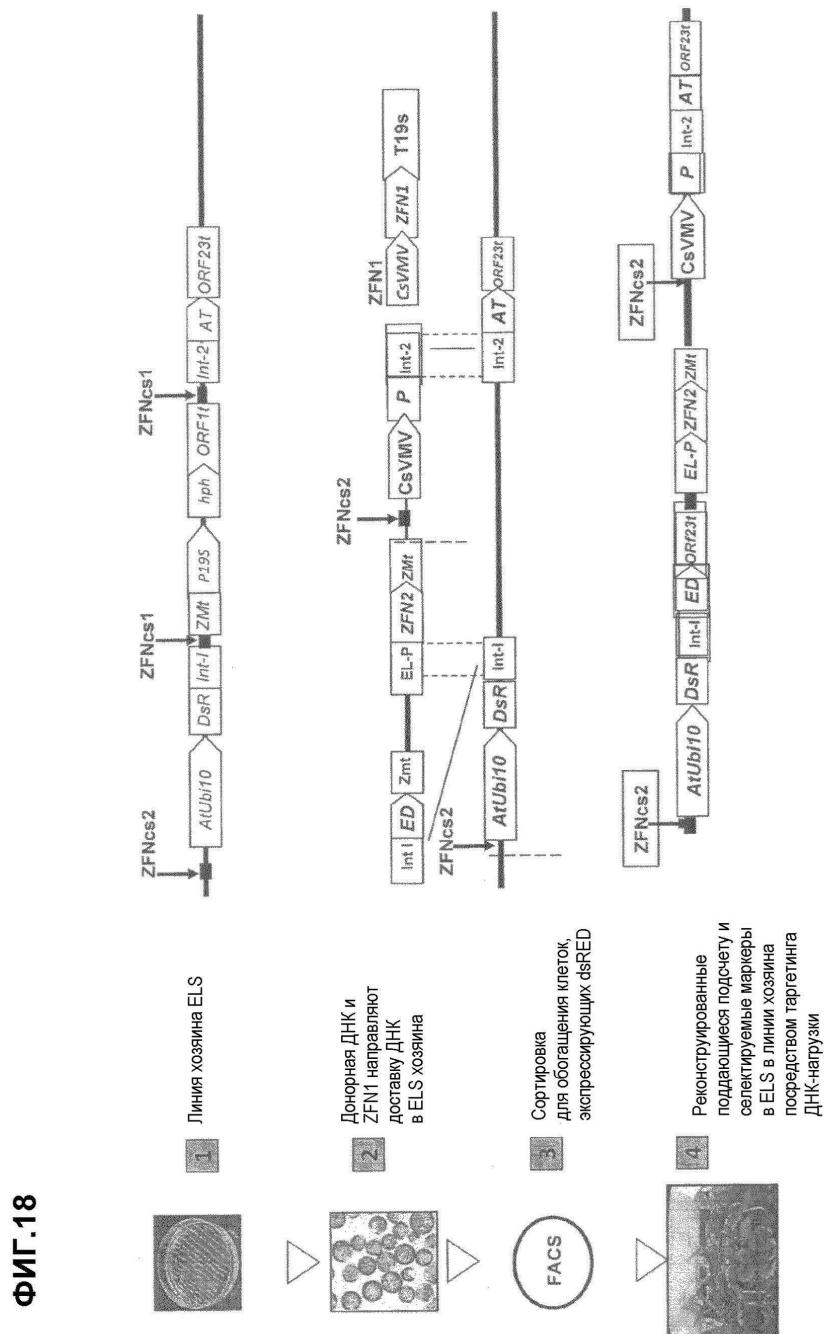


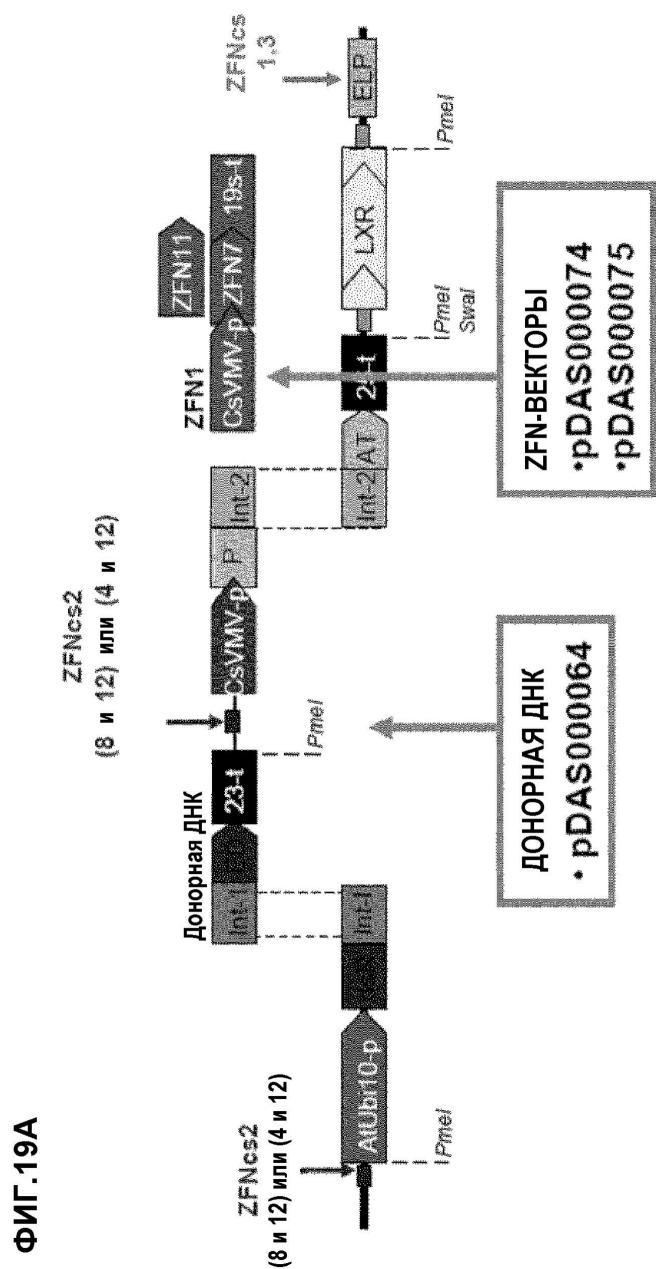
ФИГ.16



ФИГ.17

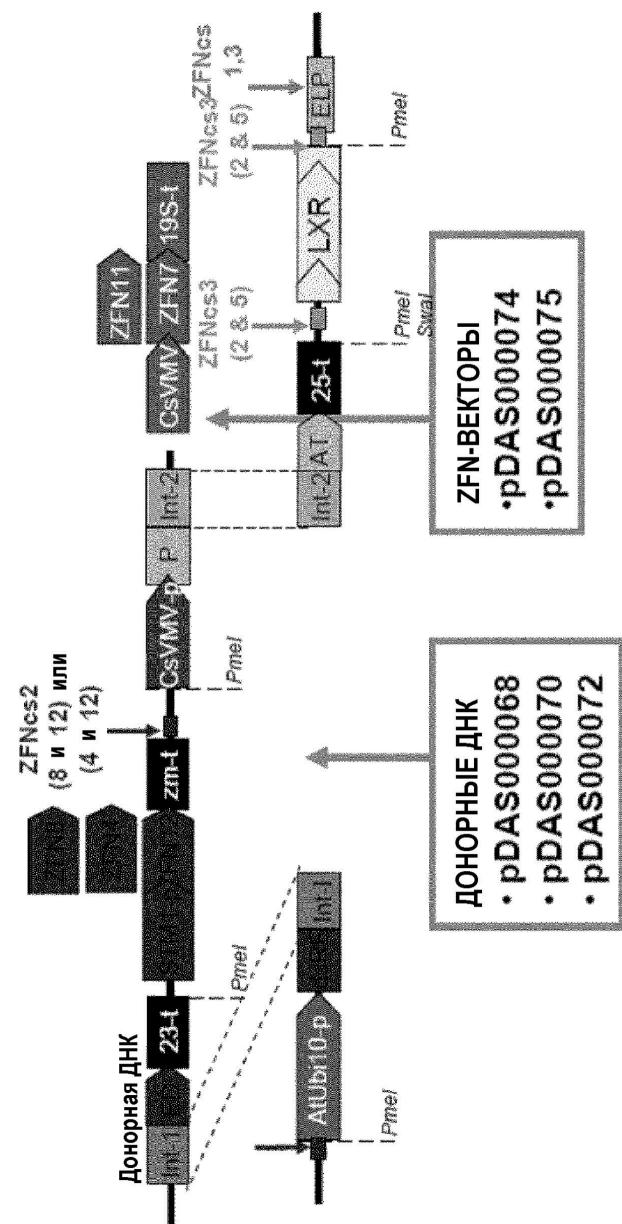
Двунитевой разрыв под действием ZFN1 индуцирует интеграцию ДНК-нагрузки в ELS
ДНК-нагрузка делает функциональными уникальные поддающиеся подсчету и селектируемые маркеры на 3'- и 5'-конце ELS
Обеспечивает быстрое выявление и селекцию точно встраиваемой в мишень ДНК-нагрузки
Включение второго уникального сайта ZFN обеспечивает возможность вырезания поддающихся подсчету маркерных генов и
других последовательностей ДНК (корикующих и некорикующих), не нужных в конечном продукте.





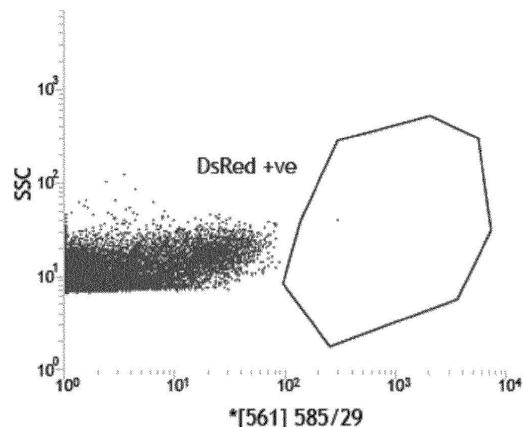
63/80

ФИГ.19В



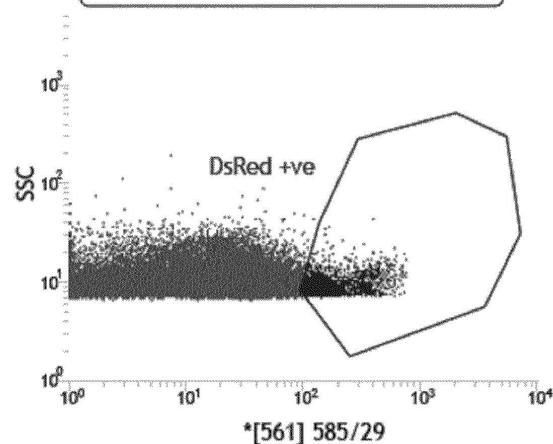
64/80

ФИГ.20



Статистика: негативный контроль_001

Популяции	События	% от исходных
Все события	50,000	####
Клетки (DsRED)	48,433	96.87%
DsRed +ve	1	0.00%

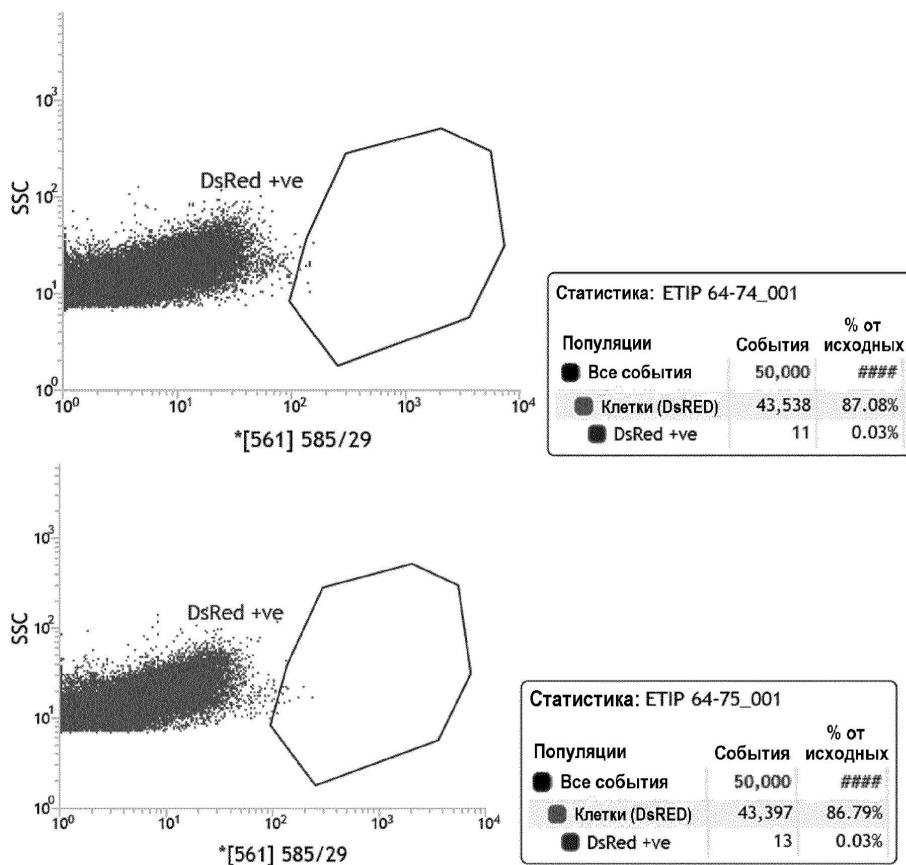


Статистика: DS-RED PDAS31 ПОЗИТИВНЫЙ КОНТРОЛЬ

Популяции	События	% от исходных
Все события	50,000	####
Клетки (DsRED)	48,801	97.60%
DsRed +ve	2,432	4.98%

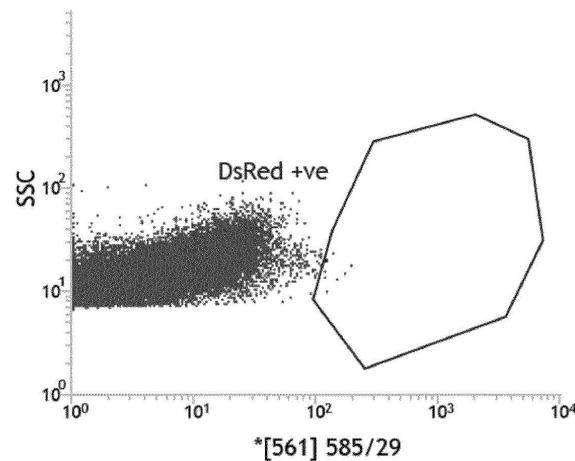
65/80

ФИГ.21

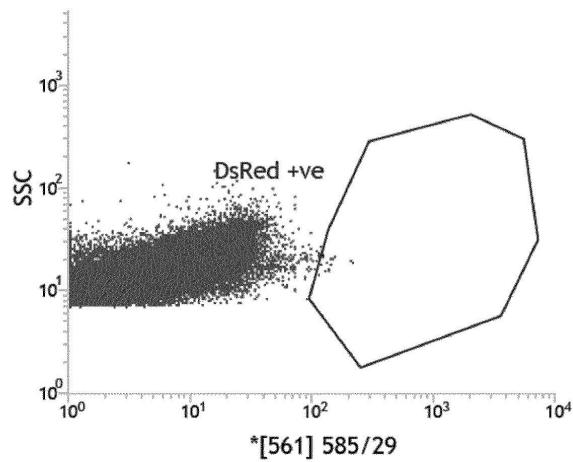


66/80

ФИГ.22



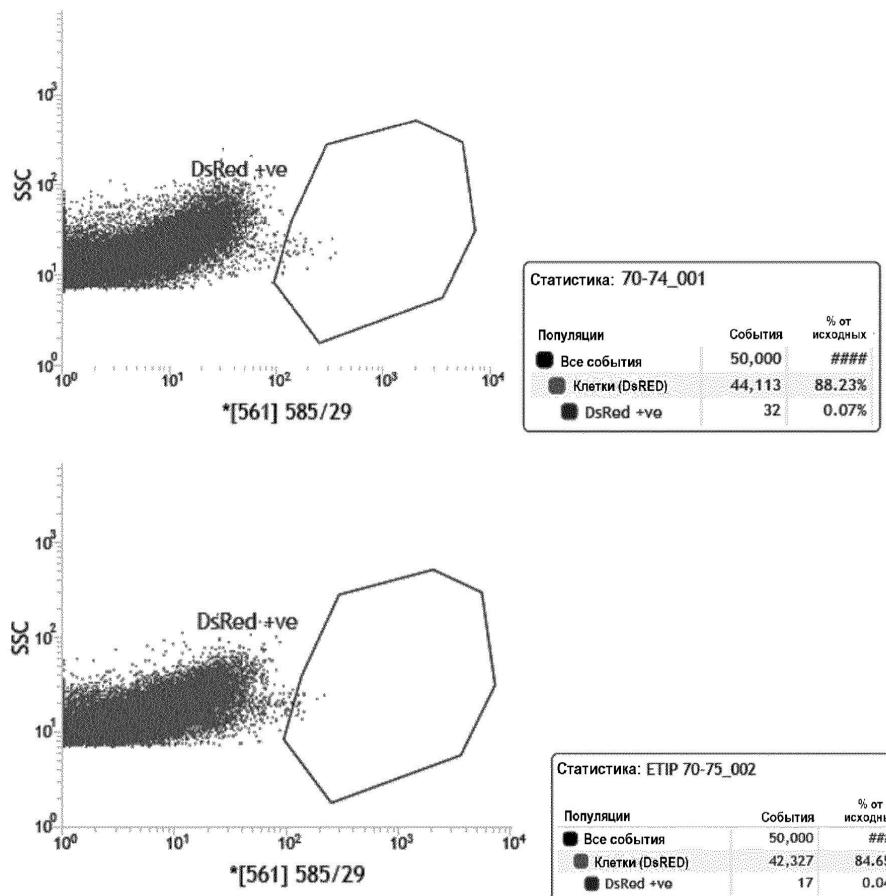
Статистика: ETIP 68-74_001		
Популяции	События	% от исходных
Все события	50,000	####
Клетки (DsRED)	43,397	86.79%
DsRed +ve	11	0.03%



Статистика: ETIP 68-75_001		
Популяции	События	% от исходных
Все события	50,000	####
Клетки (DsRED)	43,905	87.81%
DsRed +ve	19	0.04%

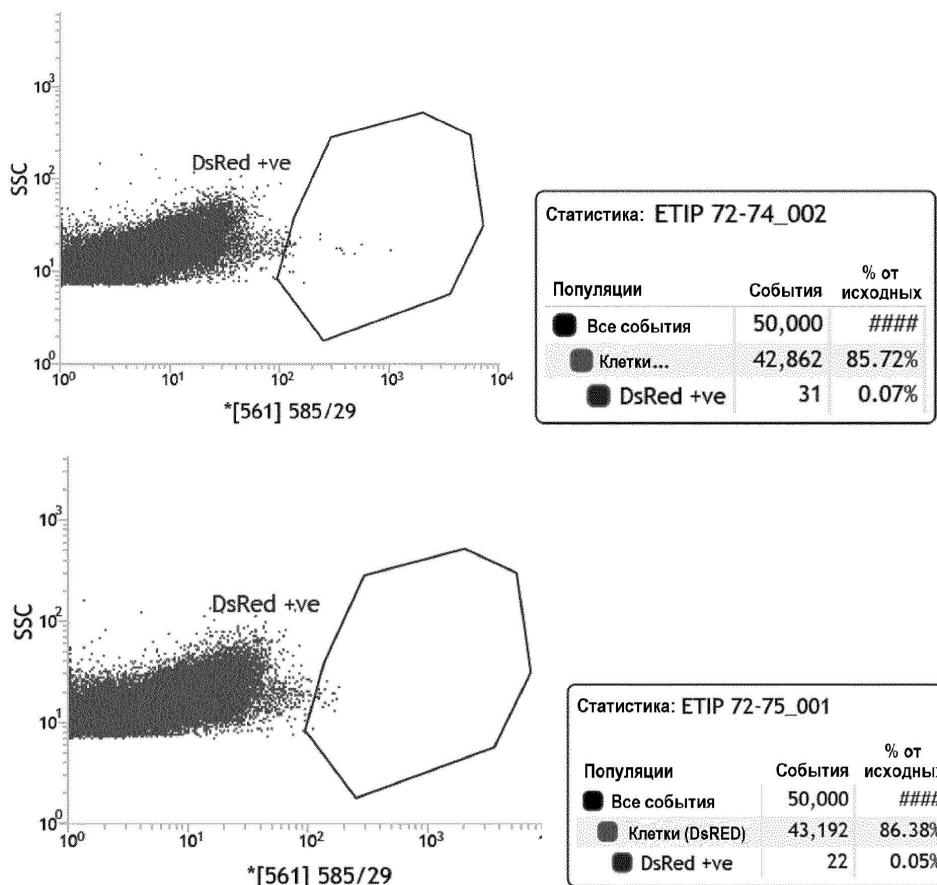
67/80

ФИГ.23

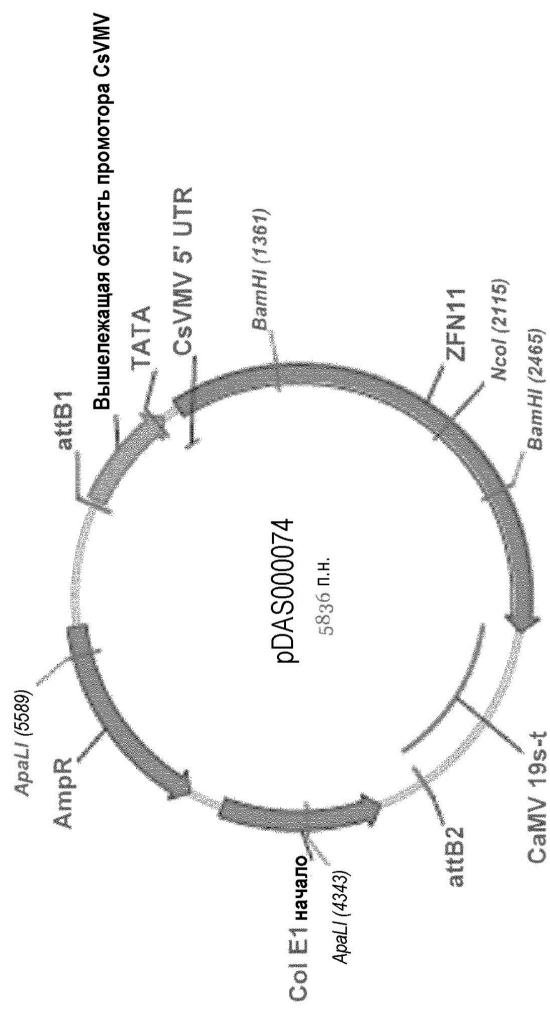


68/80

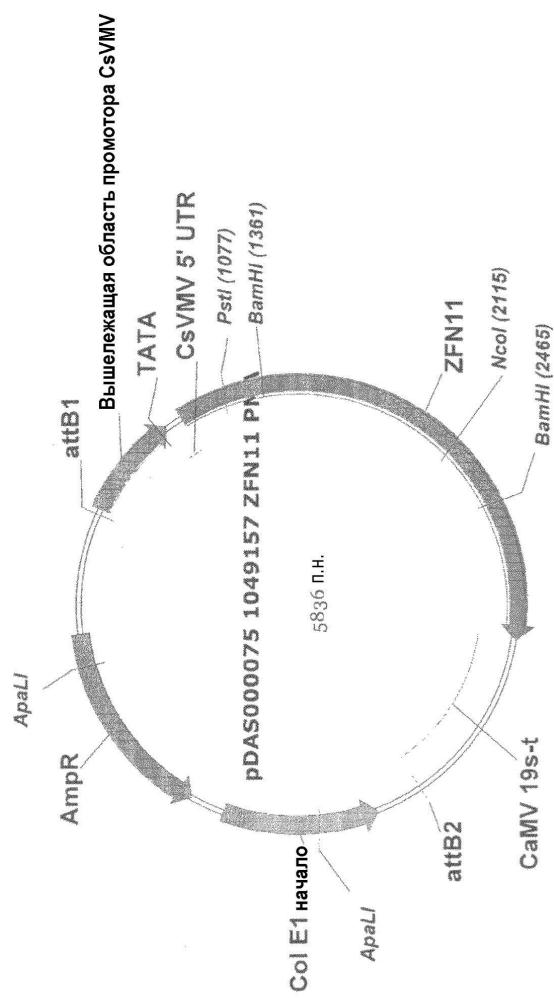
ФИГ.24



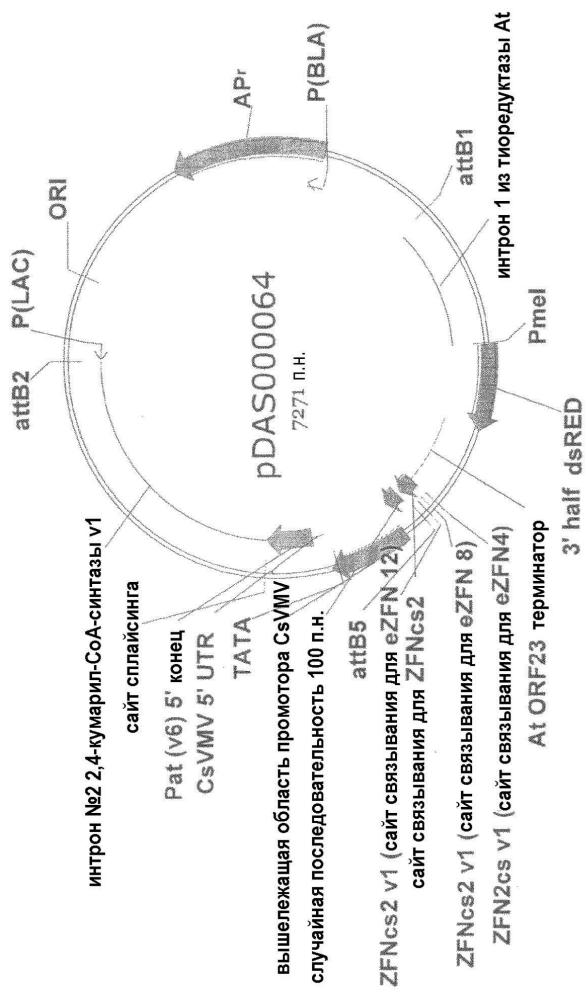
69/80



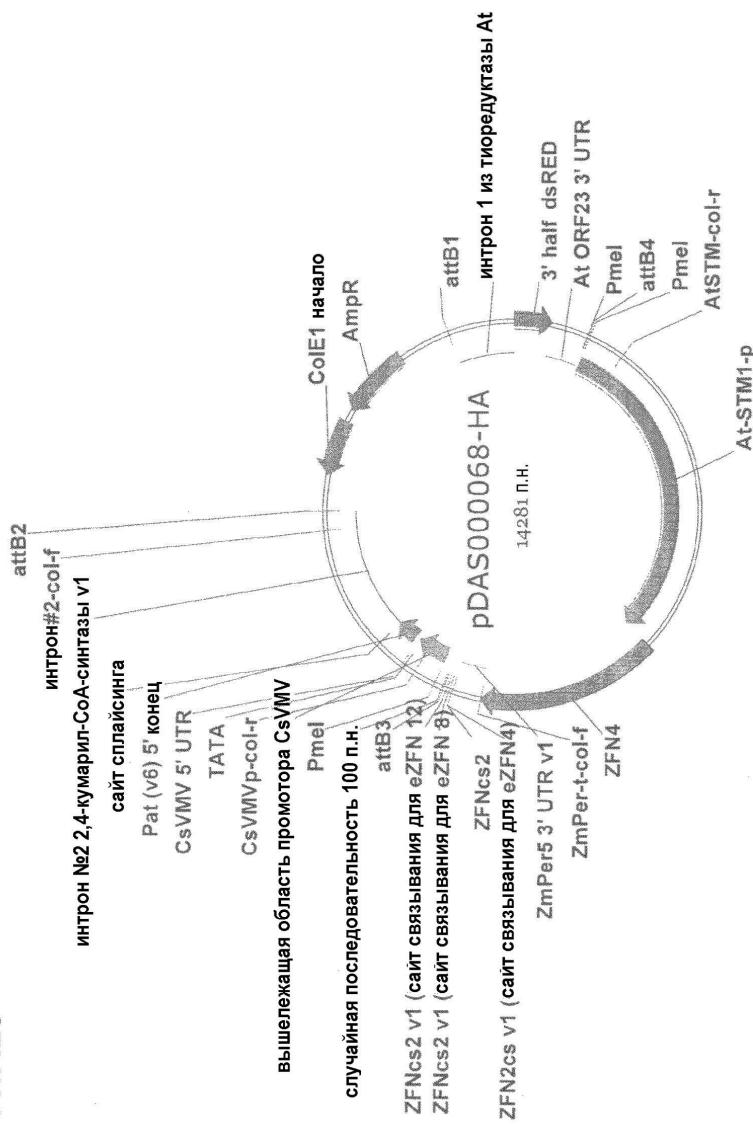
ФИГ.26



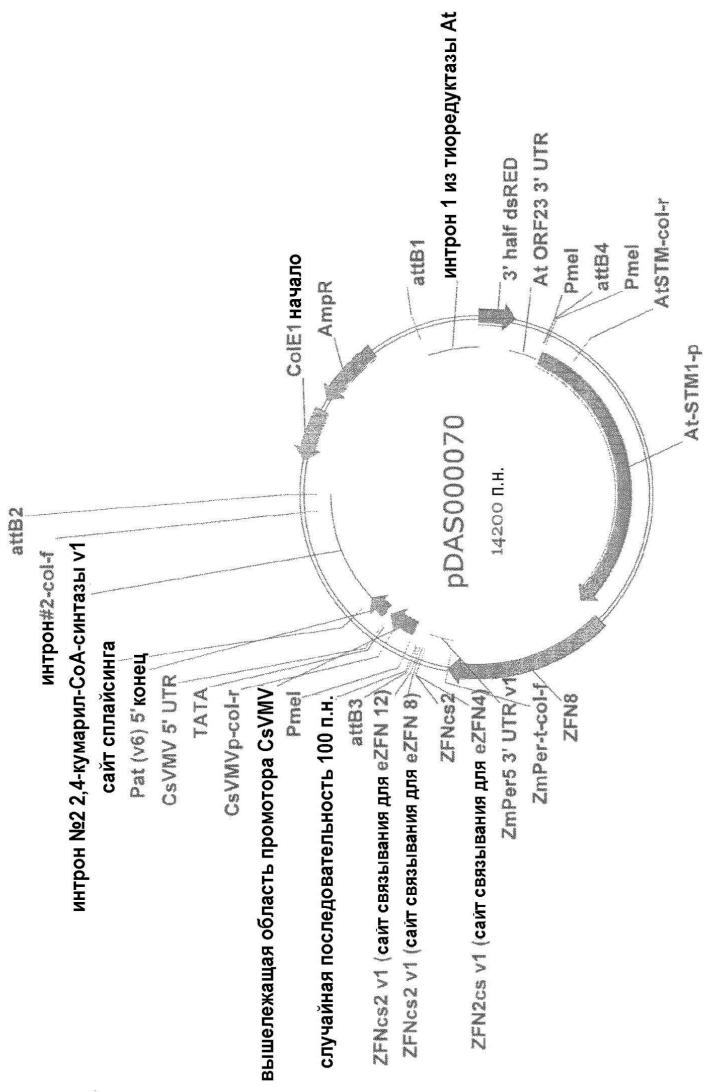
ФИГ.27



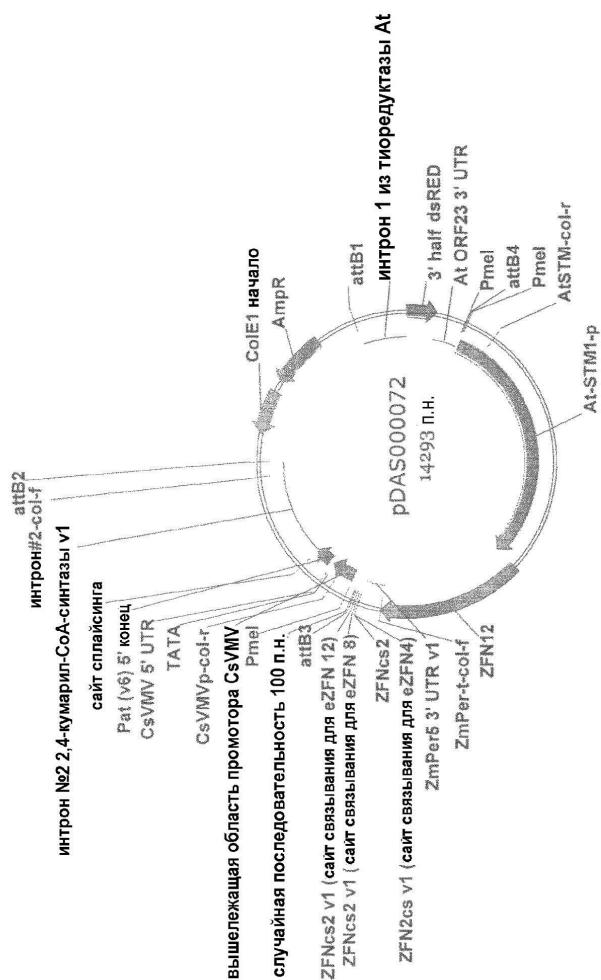
ФИГ.28



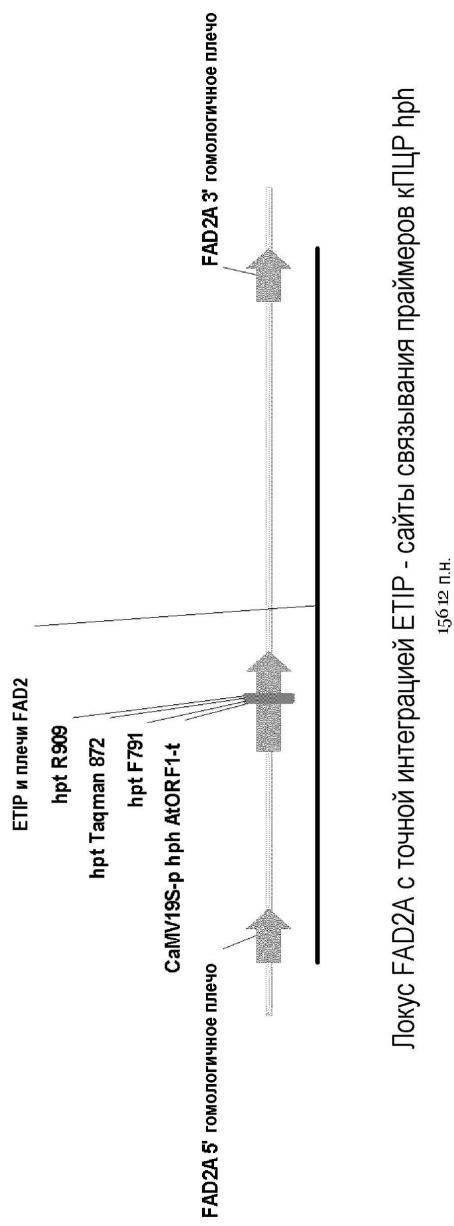
ФИГ.29



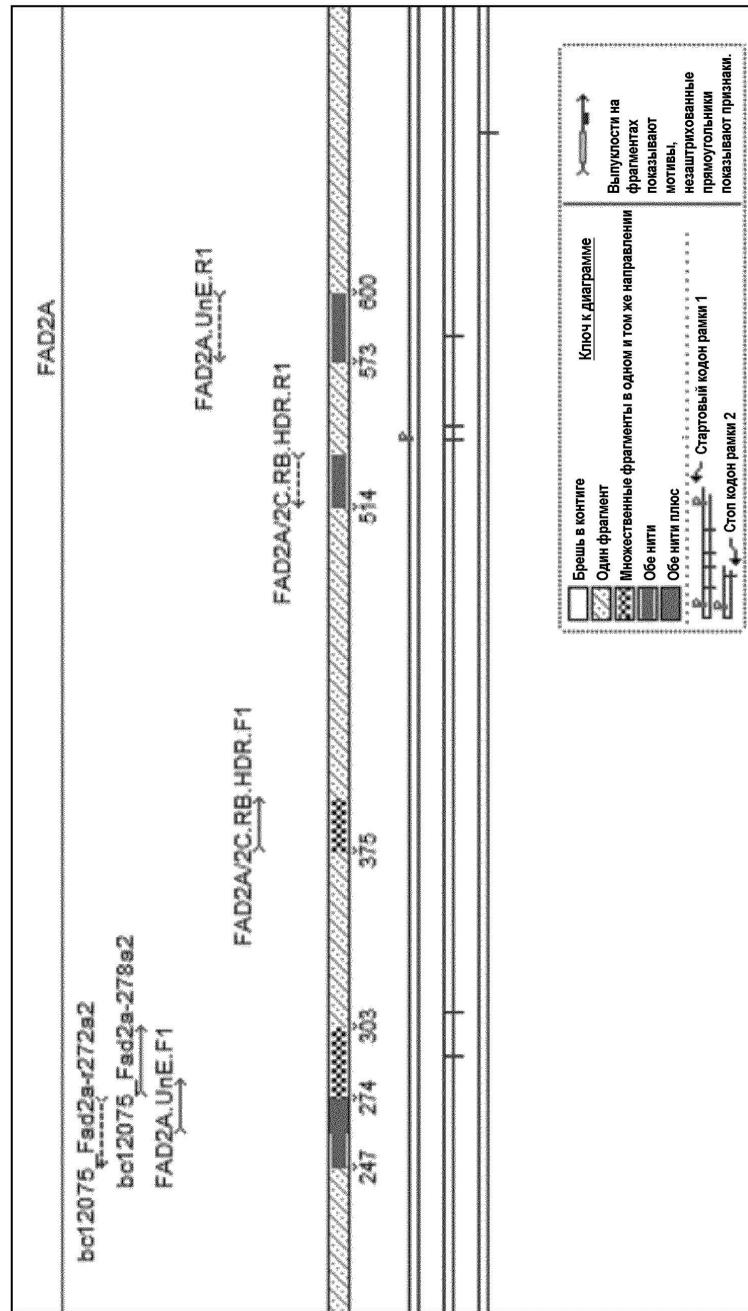
ФИГ.30



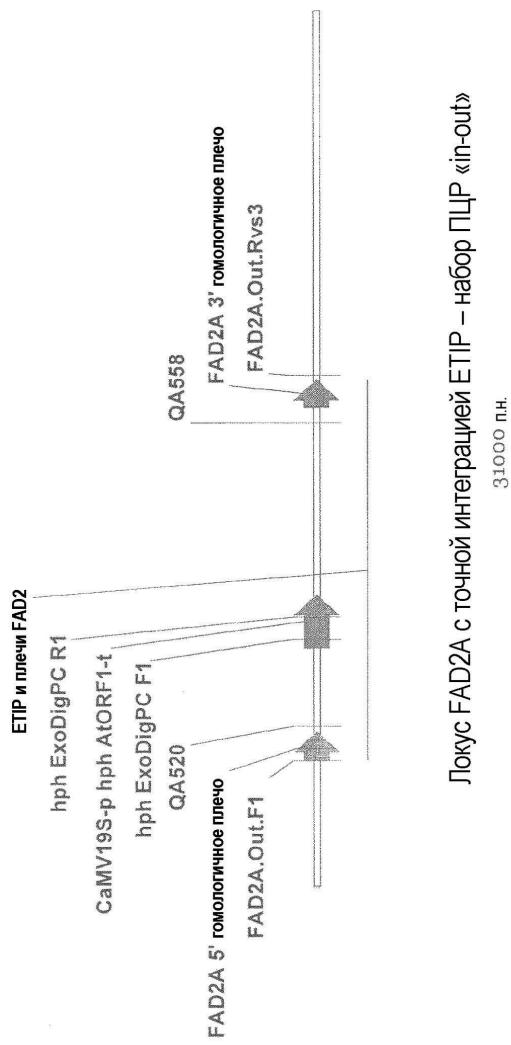
ФИГ.31

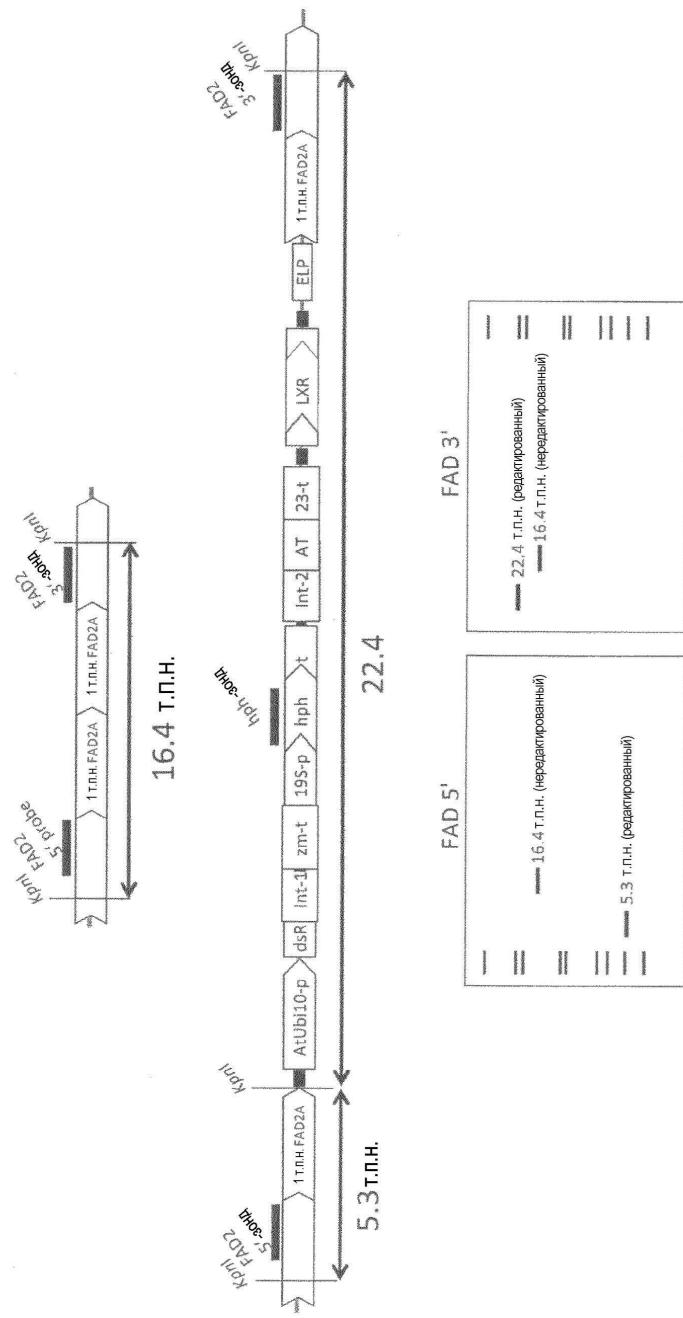


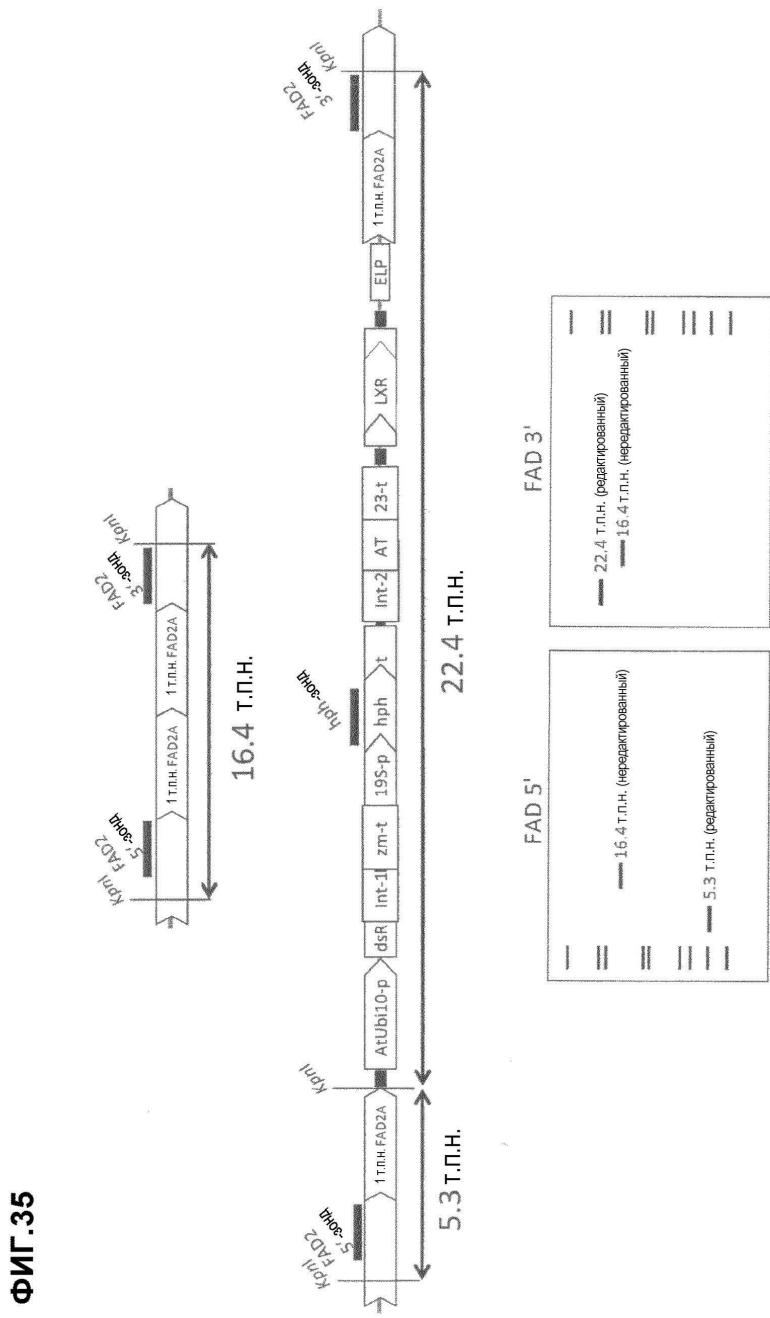
ФИГ.32



ФИГ.33



ФИГ.34



80/80

