

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ДОСТАВКИ СИСТЕМЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/CAS9 В ЗАРОДЫШЕВЫЕ КЛЕТКИ ПЫЛЬЦЫ *ALLIUM CEPA*Л.И. Хрусталева¹, А.С. Ермолаев¹, М.В. Яковцева², Н.А. Кудрявцева¹¹ Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Россия² Московский физико-технический институт, Россия

Открытие системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 создает новые возможности в получении сортов растений с заданными свойствами. Несмотря на перспективы использования геномного редактирования в медицине, именно продукты питания, полученные от отредактированных культур, будут первым результатом широкого практического использования этой новой технологии. Генетически отредактированные сорта растений будут восприниматься потребителями намного дружелюбнее, чем трансгенные растения, так как они ничем не отличаются от обычных сортов, полученных с помощью мутагенеза или спонтанного мутирования. Сегодня существует два главных фактора, препятствующих широкому внедрению геномного редактирования для создания растений с хозяйственно-ценными свойствами: 1) проблема доставки системы редактирования в растительную клетку; 2) трудности регенерации растений *in vitro*. Целью наших исследований является создание системы редактирования генома растений без внедрения чужеродной ДНК и использования *in vitro* технологий, а именно, редактирование генома, используя только протеин (эндонуклеазу) и РНК, в сочетании с 'regeneration free' системой получения отредактированных форм растений – получение напрямую семян с отредактированным геномом.

Исследования были проведены на луке репчатом (*A. cepa*). Целевым геном для редактирования был взят ген, кодирующий синтазу фактора слезотечения (LFS). Это небольшой (450 bp), однолокусный безинтронный ген (Masamura *et al.* 2012), участвующий в метаболическом пути синтеза соединений, отвечающих за вкус и запах лука. Выключение гена LFS легко определяется фенотипически. Для осуществления редактирования гена LFS с помощью системы CRISPR/Cas9 были разработаны две sgRNA, нацеленные на уникальные сайты рестрикции в гене. Это позволило создать простой молекулярный маркер для быстрой проверки события целевого редактирования. sgRNAs были подобраны с помощью программы CRISPRdirect (Naito *et al.*, 2015).

Для доставки CRISPR/Cas9 в пыльцу использовали магнитные наночастицы. Нанотехнологии позиционируются как ключевой фактор в создании инструмента доставки системы геномного редактирования в растительную клетку (Kwak *et al.* 2019). Однако возможности использования наночастиц для доставки биомолекул в растительные клетки остаются почти неизученными. Нами был проведен синтез наночастиц различной природы и с различным функциональным покрытием. Наилучшим образом себя зарекомендовали магнитные наночастицы на основе магнетита размером 60 нм, стабилизированные карбоксиметилдекстраном и покрытые FITC в качестве флуоресцентной метки для дальнейшей детекции наночастиц в тканях растений.

Для реализации экспериментальной части проекта по доставке CRISPR/Cas9 в генеративную клетку зрелой пыльцы с использованием наночастиц, была изучена структура пыльцы лука репчатого с использованием люминисцентной и электронной сканирующей микроскопии. В результате измерений длины и ширины апертуры было установлено, что длина апертуры составила 6.4 μm (max) и 1.8 μm (min) и ширина – 1.4 μm и 0.8 μm , что позволяет проход синтезированных нами наночастиц размером 60 нм.

Мы провели пилотные эксперименты по анализу проникающей способности наночастиц+FITC в пыльцевые зерна лука репчатого. Были подобраны параметры обработки пыльцы наночастицами и оптимизирована питательная среда. Обработку пыльцы наночастицами проводили в жидкой питательной среде на неодимовом магните. Жизнеспособность пыльцы после обработки проверяли путем проращивания на питательной среде. Микроскопия пыльцевых трубок показала наличие FITC сигнала внутри пыльцевых трубок, что свидетельствует о прохождении наночастиц внутрь пыльцевого зерна (предполагается через апертуру).

Для подтверждения событий редактирования после обработки пыльцы системой CRISPR/Cas9 был отработан метод прямой ПЦР пыльцы с праймерами на LFS.

Исследования по разработке способа доставки системы редактирования CRISPR/Cas9 в растительную клетку продолжаются. Апробируются и другие способы доставки.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ проекта № 20–016–00065

Литература

- Kwak, S.Y. *et al.* (2019). Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers. *Nature nanotechnology*, 14(5), 447.
- Masamura, N. *et al.* (2012). Chromosomal Organization and Sequence Diversity of Genes Encoding Lachrymatory Factor Synthase in *Allium cepa* L. G3: Genes, Genomes, Genetics, 2(6), 643–651.
- Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. (2015) CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*, 31, 1120–1123.