

УДК 577.29

## Доставка рибонуклеопротеидного комплекса CRISPR/Cas9 в клетки апикальной меристемы для бесплазмидного редактирования генома картофеля *Solanum tuberosum*

© 2018 А.В. ХРОМОВ<sup>1,2</sup>, А.В. МАХОТЕНКО<sup>1,2</sup>, Е.В. СНИГИРЬ<sup>1</sup>, С.С. МАКАРОВА<sup>1,2</sup>, В.В. МАКАРОВ<sup>1,2</sup>, Т.П. СУПРУНОВА<sup>1</sup>, Д.Н. МИРОШНИЧЕНКО<sup>1,3</sup>, Н.О. КАЛИНИНА<sup>1,2,\*</sup>, С.В. ДОЛГОВ<sup>1,3</sup>, М.Э. ТАЛЪЯНСКИЙ<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>ООО «Дока-Генные технологии» Московская обл., Рогачёво, 141880, Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

<sup>3</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН (ФИБХ), Московская область, Пушино, 142290, Россия

\*e-mail: kalinina@genebee.msu.ru

Поступила 08.06.2018 г.

После доработки 09.10.2018 г.

Принята в печать 15.12.2018 г.

Описан новый подход к редактированию генома картофеля с использованием технологии CRISPR/Cas9, основанный на доставке в клетки апикальной меристемы картофеля *Solanum tuberosum* *cv.* Chicago преформированных рибонуклеопротеидных комплексов эндонуклеазы Cas9 и короткой гидовой РНК (sgRNA) и предусматривающий регенерацию отредактированных растений. В качестве модельного гена использован ген картофеля, кодирующий фермент фитоен десатуразу. Использованы два способа доставки редактирующего комплекса в растительные клетки: бомбардмент функционализированными микрочастицами золота и вакуумная инфильтрация функционализированными микрочастицами хитозана. Генетический анализ выявил редактирование двух аллелей целевого гена при использовании метода бомбардмента и редактирование одного аллеля – при использовании метода инфильтрации. Генетические данные подтверждены ингибированием экспрессии целевого гена в обеих линиях растений-регенерантов и временным побелением растений отредактированных линий. Предложенные методы бесплазмидной доставки комплекса (белок Cas9–короткая гидовая РНК) в клетки апикальной меристемы позволяют разработать эффективную технологию редактирования генома полиплоидных культур для создания в короткие сроки нетрансгенных растений с отредактированными целевыми генами.

**Ключевые слова:** технология CRISPR/Cas9, *Solanum tuberosum*, апикальная меристема, комплекс эндонуклеазы Cas9–короткая гидовая РНК, бомбардмент, вакуумная инфильтрация, редактирование гена фитоен десатуразы.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-6-51-58

Направленное редактирование генома с помощью специфичных к целевой последовательности ДНК нуклеаз, обеспечивающее возможность быстрой, точной и прогнозируемой модификации целевого гена, является современным подходом, позволяющим существенно повысить эффективность селекции разнообразных сельскохозяйственных культур. Одна из новейших и наиболее передовых технологий

редактирования генома, основанная на системе CRISPR/Cas9, отличается простотой, доступностью и универсальностью (применима для многих целей), по сравнению с другими аналогичными технологиями, такими как ZNF и TALEN [1]. Технология CRISPR уже привела к заметному прогрессу практически во всех областях наук о жизни, включая биотехнологию и медицину, и в настоящее время рассматривается как

Список сокращений: ГМО – генно-модифицированный организм; sgRNA – короткая гидовая РНК; МС – питательная среда Мурасиге и Скуга; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; РАМ сайт – мотив, связанный с прото-спэйсером; РНП-комплекс – рибонуклеопротеидный комплекс; ТПФ – триполифосфат натрия; NGS – секвенирование нового поколения (next generation sequencing); PDS – фитоен десатураза.

одна из наиболее перспективных в растениеводстве [2, 3]. Однако существующие методы направленной доставки системы CRISPR/Cas9 в клетки растений с использованием агробактерий ограничивают возможности применения данной технологии, поскольку относятся к технологиям генетической модификации организмов (ГМО). Нежелательные вставки последовательностей плазмидной ДНК и постоянная экспрессия эндонуклеазы Cas9 или иных компонентов системы редактирования с внесенных плазмид способны вызывать нецелевые эффекты различной интенсивности, а присутствие чужеродной ДНК в клетках растения позволяет рассматривать эти растения как ГМО со всеми применяемыми к ним регуляторными ограничениями [4].

В настоящее время активно разрабатываются способы доставки, основанные на физическом внедрении ДНК в клетку путем бомбардировки ее микрочастицами (биобаллистика или сокращенно биолистика) нетоксичных металлов золота или вольфрама диаметром от 0,4 до 1,2 мкм с иммобилизованной на их поверхности ДНК. Метод бомбардировки микрочастицами позволяет трансформировать растения практически любых видов. Но при этом известно, что трансформация происходит с невысокой частотой, а интеграция и экспрессия чужеродных генов может зависеть от вектора, используемого для их введения [5]. Вместе с тем, все более перспективными становятся методы бесплазмидной доставки в клетки растений редактирующего рибонуклеопротеидного (РНП) комплекса CRISPR/Cas9, включающего эндонуклеазу Cas9 и короткую гидовую РНК (sgRNA), без использования плазмидной ДНК [6]. Эти методы уже продемонстрировали свою эффективность при редактировании геномов кукурузы, пшеницы и картофеля методом бомбардировки эмбриональных клеток микрочастицами золота с иммобилизованными комплексами CRISPR/Cas9 [7–9]. Преимуществом подобного метода доставки является снижение вероятности разрезания геномной ДНК в нецелевом участке (off-target-эффект), по сравнению с доставкой при помощи агробактерий, поскольку время жизни доставленного в клетки РНП-комплекса заметно меньше, чем при его экспрессии с ДНК. Бесплазмидные технологии редактирования генома растений не являются технологиями ГМО и, следовательно, отредактированные с их помощью растения не попадают под законодательство о запрете использования ГМО в сельском хозяйстве.

Цель настоящей работы – редактирование генома картофеля путем доставки в клетки апикальной меристемы картофеля РНП-комплексов CRISPR/Cas9 с последующей регенерацией отредактированных растений. Преформированные РНП-комплексы предполагалось доставлять в клетки меристемы путем бомбардировки микрочастицами золота или путем вакуумной инфльтрации клеток микрочастицами хитозана, функционализированными РНП-комплексами.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Получение РНП-комплекса Cas9–sgRNA

Для оценки предлагаемой технологии доставки системы CRISPR/Cas9 в клетки растений картофеля и тестирования ее активности как редактора генома был использован ген картофеля, кодирующий фермент фитоен десатуразу (PDS). В экспериментах использовали sgRNA к участку гена, кодирующему N-концевую часть белка PDS, которая обеспечивала *in vitro* разрезание рекомбинантной нуклеазой Cas9 целевого фрагмента ДНК с эффективностью 90–100%. Синтез *in vitro* и анализ активности sgRNA детально описаны в статье Хромова и соавт. [10]. Рекомбинантную эндонуклеазу Cas9 (30 нмоль) (EnGen® Cas9 NLS, S. Pyogenes, New England BioLabs), синтезированную *in vitro* sgRNA (30 нмоль) смешивали в реакционном буфере, содержащем 20 мМ HEPES, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мМ EDTA с pH 6,5 (New England BioLabs) и инкубировали в течение 15 мин при 25 °С для формирования РНП-комплекса.

### Растительный материал

Для геномного редактирования использованы апикальные зоны делящихся клеток, выделенные из верхушечных и боковых побегов картофеля размером около 100–200 мкм. Апикальные меристемы выделяли из зеленых ростков пазушных почек растений *in vitro* картофеля *Solanum tuberosum* cv. Chicago (сорт ««чикаго»», тетраплоид). Перед вычленением с верхушки ростка удаляли верхние покровные листочки, оставляя апикальную зону с примордиальными листочками. Вычленение меристем проводилось в стерильных условиях под бинокулярным микроскопом (Stemi DV4, Zeiss) с 24-кратным увеличением. После вычленения меристемы переносили в чашки Петри (по 30 меристем на 1 чашку) на поверхность питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) без добавления гормонов. Сорт «чикаго» был выбран

как хорошо охарактеризованный по физиологическим параметрам: сорт легко и быстро образует регенеранты из листовых экплантов и апикальных меристем на питательной среде.

### Методы доставки системы CRISPR/Cas9 в клетки растений картофеля

Для редактирования гена *PDS* апикальные меристемы картофеля подвергались или бомбардменту золотыми микрочастицами (0,6 мкм), или инфльтрации микрочастицами хитозана (0,6–0,8 мкм), которые были функционализированы РНП-комплексом Cas9–sgRNA. К 80 мкл суспензии микрочастиц золота, предварительно обработанных ультразвуком, вносили 20 мкл РНП-комплекса и полученные пробы высушивали на специальных мембранах при 37 °С. Биолистический бомбардмент апикальных меристем картофеля проводили с использованием разрывных дисков 6,2 МПа на расстоянии 9 см до объекта с помощью генной пушки PDS-1000/He (Bio-Rad, США). Метод инфльтрации микрочастиц хитозана, функционализированных РНП-комплексом Cas9–sgRNA был предложен в качестве альтернативного метода доставки компонентов системы CRISPR/Cas9. Инфльтрацию РНП-комплексов в клетки апикальных меристем проводили в стерильных условиях в вакуумной камере генной пушки PDS-1000/He (Bio-Rad) при ~90 кПа в течение 1 мин. Для получения микрочастиц хитозана (Sigma) в концентрации 1,75 мг/мл растворяли в 30 мМ Na-ацетатном буфере (рН 4,5) при постоянном встряхивании. Затем к раствору добавляли водный раствор триполифосфата натрия (ТПФ) (Галрехим, Россия) в концентрации 1 мг/мл в соотношении хитозан:ТПФ, равном 5:2. Данные условия приводили к формированию гомогенного препарата частиц хитозана с диаметром 600–800 нм, фазово-контрастное изображение которого было получено с помощью моторизованного инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия) [11]. Исходный раствор частиц хитозана (рН 4,5) нейтролизовали добавлением 10%-ного раствора NaOH до рН 6,5, после чего к нему добавляли РНП-комплекс Cas9–sgRNA, перемешивали и обрабатывали ультразвуком с частотой 50/60 Гц при комнатной температуре в течение 10 мин с использованием ультразвуковой мойки Elmasonic S 300H (Elma Ultrasonic, Германия). Эффективность загрузки платформ (микрочастиц) макромолекулами (белок, РНК и ДНК) ранее была оценена

отношением количества флуоресцирующих частиц, связавших флуоресцентно-меченные препараты макромолекул, к общему количеству частиц, видимых в световом поле (метод флуоресцентной микроскопии) [12].

### Регенерация растений из клеток меристемы после доставки системы CRISPR/Cas9

Обработанные РНП-комплексом Cas9–sgRNA меристемы переносили в чашки Петри с питательной средой МС с добавлением следующих фитогормонов, мг/л: 6-бензиламинопурин – 2, гиббереллиновая кислота – 0,5 и цефотаксима – 500. Чашки Петри с выделенными меристемами инкубировали в световом модуле в контролируемых условиях с освещенностью 5 тыс. лк, фотопериодом 16/8 ч и температурой 21–22 °С в течение 3–4 нед. Регенерированные растения достигали стадии 3–4 междоузлий за 4–5 недель, причем до 80% меристем развивались в нормальные растения.

### Экспериментальное доказательство факта редактирования гена *PDS*

Из общего числа регенерантов отбирали линии с побелением листьев, из которых выделяли геномную ДНК. В качестве отрицательного контроля использовали геномную ДНК исходных (необработанных) растений картофеля сорта ««чикаго»». ДНК выделяли из 50 мг растительного материала растений с использованием набора GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific, США). Фрагмент целевой нуклеотидной последовательности размером 80 пн амплифицировали с помощью Encyclo полимеразы (Евроген) с соответствующими праймерами прямым >StL23\_300\_F (5'-AGATAAAAAGGGTTTGGAGTCCCTCTAC-3') и обратным >StL23\_300\_R (5'-TCTCTGACCGATTCSTTCCATCTTTCT-3'), клонировали в вектор pAL2TA (Евроген, Россия) и полученными конструкциями трансформировали в *E.coli*. Для одной контрольной и двух потенциально отредактированных линий (по одной линии для каждого из способов доставки РНП-комплекса) получали не менее 30 колоний, из которых выделяли плазмидную ДНК, которую в дальнейшем секвенировали с универсальным праймером M13 Forward 5'-GTTGTAACGACGGCCAGTG-3'.

### Метод глубокого секвенирования NGS

Фрагмент ДНК размером около 1500 пн, включающий предполагаемый участок связывания sgRNA, амплифицировали двумя раундами

ПЦР. В первом раунде были использованы праймеры, фланкирующие этот фрагмент. Для второго раунда амплификации в пробы вносили прямой и обратный баркоды к концам ПЦР-продукта для создания библиотеки. Равные количества ПЦР-продуктов смешивали, и полученные образцы использовали для секвенирования на MiSeq-секвенаторе (Illumina Inc, США).

### Анализ уровня экспрессии целевого гена методом полуколичественной ПЦР

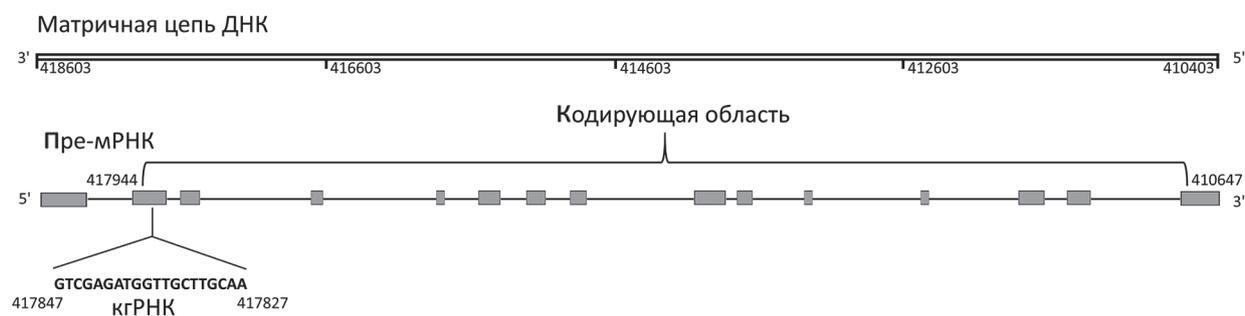
Из образцов растений-регенерантов выделялась тотальная РНК ExtractRNA (Евроген), производилось ферментативное удаление ДНК с помощью ДНКазы I, (ThermoFisher Scientific). После измерения концентрации на микроспектрофотометре NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific) и выравнивания концентрации РНК в образцах проводилась реакция обратной транскрипции с помощью набора MMLV RT (Евроген). В качестве гена сравнения использовался ген *L23*, кодирующий один из белков 60S субъединицы рибосомы. Фрагмент размером 80 пн амплифицировали с соответствующими праймерами – StL23\_300\_F и StL23\_300\_R. В качестве ампликона целевого гена использовался фрагмент первого экзона гена *PDS* размером 186 пн, который амплифицировали с соответствующими праймерами – прямым PDS\_Se\_F (5'-TGAGAGTCCAAGGTTAGTTCAGCT-3') и обратным PDS\_Se\_R (5'-AAGGCCCAAGTCCTTACC-3'). Уровень экспрессии целевого гена оценивали после выравнивания образцов по уровню экспрессии гена *L23* методом электрофореза в агарозном геле.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фитоен десатураза (phytoene desaturase, PDS) катализирует ключевой этап биосинтеза каротиноидов, защищающих хлорофилл от фотоокисления; таким образом, выключение (нокаут) этого гена приводит к появлению белых пятен на листьях растения. Использование этого гена в качестве маркера позволяет выполнять визуальный отбор редактированных клеток или тканей. Ранее мы провели дизайн шести sgRNA к различным участкам гена *PDS*, транскрибировали эти sgRNA и показали, что пять из них были активны в опытах *in vitro* при разрезании целевого субстрата эндонуклеазой Cas9. Для дальнейшей работы нами была отобрана sgRNA1 к участку гена, кодирующему N-концевую область белка PDS (рис. 1).

Коммерческий препарат эндонуклеазы Cas9 инкубировали с sgRNA1, и полученные РНП-комплексы доставляли в клетки меристемы путем бомбардмента микрочастицами золота (0,6 мкм) или путем инфильтрации клеток микрочастицами хитозана (0,6–0,8 мкм), покрытыми (функционализированными) РНП-комплексами, с использованием генной гелевой пушки. Меристемы, подвергнутые бомбардменту или инфильтрации частицами, покрытыми только белком Cas9, использовали в качестве отрицательного контроля.

Визуальная оценка полученных растений-регенерантов показала, что эффективность редактирования (побеление листьев растений) при доставке редактора методом бомбардмента функционализированными микрочастицами золота составила 2 линии из 90, а методом инфильтрации –



**Рис. 1.** Структура гена *PDS* картофеля. Позиции нуклеотидов на матричной цепи ДНК соответствуют приведенным в базе данных (идентификационный номер NW\_006238964, GenBank). Прямоугольники – экзоны, сплошная линия – интроны. Вынесен участок гена, на который нацелена sgRNA

**Fig. 1.** Schematic representation of the potato *PDS* gene structure. The positions of nucleotides on the DNA matrix chain correspond to those given in the database (accession number NW\_006238964, GenBank). The exons are shown as rectangles, the introns are shown by a solid line. The coding region and the region of the gene to which the guide RNA (sgRNA) is targeted are marked

13 линий из 115. Из растений-регенерантов отобранных линий выделяли суммарный препарат ДНК, далее фрагмент целевой последовательности амплифицировали и клонировали в *E. coli*. Для контрольной и отредактированных линий получали не менее 30 колоний, из которых выделяли ДНК, проводили амплификацию фрагмента последовательности гена *PDS*, которая подвергалась редактированию, и полученный ПЦР-продукт секвенировали. На рис. 2 приведены результаты анализа растения, обработанного частицами, функционализированными только белком Cas9 (контроль), и двух отобранных линий, обработанных РНП-комплексами.

Прежде всего, в обработанных РНП-комплексами (отредактированных) и контрольных растениях были идентифицированы четыре аллеля, обозначенные как A1, A2, A3 и A4 (рис. 2). Однако, в отличие от контрольных растений, в обеих отредактированных линиях – B10 (бомбардмент) и J83 (инфильтрация) – обнаруживались только три из четырех аллелей: в линии B10 – аллели A1, A2 и A4, а в линии J83 – аллели A1, A2 и A3. Более того, аллель A1 из линии B10 обнаруживается только в 1 из 30 клонов (аллель A1\*). Эти результаты могут быть объяснены тем, что протяженные нуклеотидные последовательности в аллелях A1 и A3 из линии B10 и в аллеле 4 из линии J83 делетированы в составе фрагмента, связывающего гидовую РНК, вследствие чего они не амплифицируются при проведении ПЦР.

Для проверки такого предположения был проведен поиск длинных делеций с использованием NGS-секвенирования области ДНК размером око-

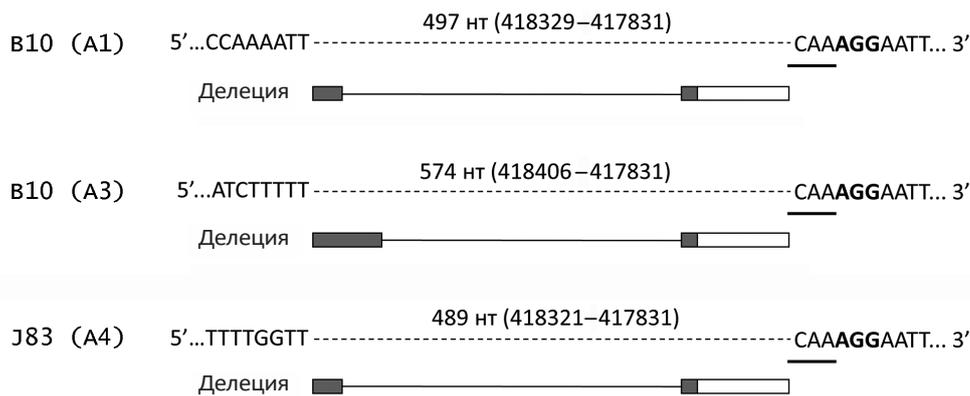
ло 1500 пн, которая включает участок, комплементарный гидовой РНК. В результате были обнаружены длинные делеции размером 489–574 пн в гене *PDS* у линий B10 (аллели A1, A3) и J83 (аллель A4), отредактированных РНП-комплексом Cas9–sgRNA (рис. 3). В контрольных необработанных растениях такие делеции выявлены не были.

Обычно, геномное редактирование ДНК системой CRISPR/Cas9 приводит к появлению вставок и/или делеций (инделей) размером менее 20 пн [12–14]. Тем не менее, при редактировании генома системой CRISPR/Cas9 были описаны и более протяженные делеции (до 1500 пн) [15–18]. Следует отметить, что все обнаруженные в данной работе делеции частично затрагивают два 5'-концевых экзона и полностью элиминируют интрон между ними (рис. 3), что приводит к значительному снижению экспрессии гена *PDS* в линиях B10 и J83 по сравнению с контрольным (нередактированным) растением (показано методом ОТ-ПЦР, рис. 4a). Наблюдаемое снижение экспрессии, может объясняться изменением нормального процесса сплайсинга пре-мРНК, приводящего к деградации транскрипта. В целом редактирование гена *PDS* затрагивает не более двух аллелей (линия B10), что может объяснить полученные нами результаты визуального наблюдения отредактированных линий: побеление листьев наблюдается на ранних этапах развития растения (до 7–8 листка проростка) и исчезает при его дальнейшем росте (рис. 4b, 4c). Очень низкая частота аллеля A1 (A1\*) в линии B10 может указывать на химерную природу отредактированного растения. Однако большинство клеток, видимо, химерами не являются.



Рис. 2. Нуклеотидная последовательность целевого фрагмента в гене *PDS* контрольного нередактированного растения и отредактированных линий B10 и J83. Выявленные аллели обозначены как A1, A2, A3 и A4; «жирный шрифт» – нуклеотидные замены, характерные для выявленных аллелей, и делеция в аллеле A4; пунктирная линия – делетированные нуклеотиды. Подчеркнута последовательность гена, на которую нацелена sgRNA. PAM-сайт отмечен жирным шрифтом с подчеркиванием

Fig. 2. The nucleotide sequence of the target *PDS* gene fragment of the control unedited plant and the edited lines B10 and J83. Identified alleles are shown as A1, A2, A3, and A4; nucleotide substitutions observed in the identified alleles and deletion in the A4 allele are marked in bold; deleted nucleotides are shown by dashed line. sgRNA targets the underlined gene sequence. PAM site is marked in bold and underlined



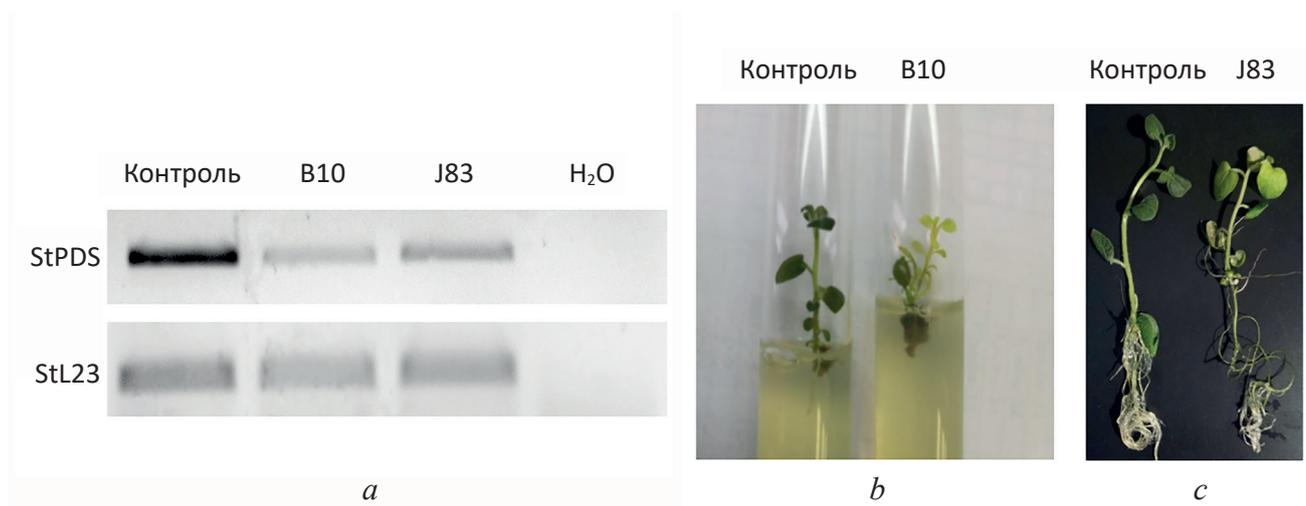
**Рис. 3.** Протяженные делеции в аллелях гена *PDS* линий В10 и J83. Делеции нуклеотидов показаны пунктирной линией, в скобках даны позиции первого и последнего нуклеотида в ориентации, соответствующей базе данных (идентификационный номер NW\_006238964, GenBank). Белые прямоугольники – экзоны кодирующей области, серые – экзоны нетранслируемой области, UTR. Подчеркнут участок последовательности гена, на которую нацелена sgRNA слева от РАМ-сайта, отмеченного жирным шрифтом

**Fig. 3.** Long deletions in the *PDS* gene alleles of the B10 and J83 lines. Nucleotide deletions are shown by dashed lines. The size of the deletion is indicated in nt, the positions of the first and the last nucleotides in the orientation corresponding to the database (accession number NW\_006238964, GenBank) are shown in round brackets. The rectangles correspond to the exons (the white to the coding regions, the gray to the non-translated regions, UTR). The position of the guide RNA is shown by a straight line to the left of the PAM site, marked in bold

В работах по редактированию генома картофеля, который является тетраплоидом, исследователи использовали метод трансфекции плазмидной ДНК [19] или бесплазмидную доставку РНП-комплекса CRISPR/Cas9 [9] в изолированные протопласты картофеля. В этом случае удалось отре-

дактировать четыре аллеля целевого гена. Вместе с тем известно, что получение протопластов картофеля является трудоемкой задачей, а последующий процесс регенерации занимает от 6 до 9 мес.

В настоящей работе для разработки значительно менее трудоемкого метода редактирования



**Рис. 4.** Уровень экспрессии гена *PDS* в контрольном растении и редактированных линиях растений-регенерантов, определенный методом полуколичественного ОТ-ПЦР, в сравнении с уровнем экспрессии гена белка L23 большой субъединицы рибосомы (a) и внешний вид растений-регенерантов линий картофеля, редактированных по гену *PDS* с использованием методов бесплазмидной доставки комплекса CRISPR/Cas9 (b, c)

**Fig. 4.** The *PDS* gene expression level in the control plant and the edited lines determined by the semi-quantitative RT-PCR method in comparison with the expression level of the gene of L23 protein of large ribosomal subunit (a) and appearance of regenerated plants of the potato lines edited by using the plasmid-free methods of the CRISPR/Cas9 complex delivery (b, c)

генома картофеля с помощью доставки РНП-комплекса CRISPR/Cas9 использовались клетки апикальной меристемы растения. Ключевым преимуществом апикальной меристемы является простота дальнейшей регенерации в целые растения, которая широко используется в производстве безвирусного картофеля и таким образом не требует дополнительной технологической адаптации. Кроме того, процесс регенерации занимает не более двух месяцев.

Для доставки РНП-комплекса CRISPR/Cas9 применен достаточно широко используемый метод бомбардмента клеток РНП-комплексами, иммобилизованными на микрочастицах золота [5, 6], и новый ранее не применявшийся метод инфльтрации РНП-комплексов, иммобилизованных на микрочастицах хитозана. Известно, что хитозан благодаря своей поликатионной природе способен образовывать полиэлектролитные комплексы с отрицательно заряженными полимерами, такими как нуклеиновые кислоты, белки, нуклеопротеиды и способствует проникновению макромолекулярных комплексов в растительные клетки [20, 21].

В редактируемой последовательности были выявлены протяженные делеции в 1 аллеле (линия J83) и в 2 аллелях (линия В10), начинающихся за три нуклеотида до РАМ-сайта и частично затрагивающих участок связывания sgRNA (рис. 3). Следует отметить, что протяженные делеции (до 1500 пн) при редактировании геномов в клетках человека и животных системой CRISPR/Cas9 были описаны ранее [15–17]). Согласно недавним исследованиям, индукция таких протяженных делеций при действии системы CRISPR/Cas9 не является редким событием, а представляет собой отличительную особенность активно транскрибируемых локусов ДНК и ДНК клеток с повышенной митотической активностью [18]. Данные настоящего исследования полностью согласуются с этим наблюдением, поскольку клетки апикальной меристемы являются низко дифференцированными быстро делящимися клетками.

При редактировании генома в протопластах картофеля в последовательности целевого гена были обнаружены и описаны только одиночные индели [19, 20]. Обнаружения длинных делеций при редактировании генома растений ранее описано не было. Различия в характере редактирования генов картофеля при использовании системы CRISPR/Cas9, весьма вероятно, объясняются физиологическим статусом редактируемых клеток.

Дальнейшая оптимизация предложенных методов доставки комплексов CRISPR/Cas9 поможет разработать эффективную технологию редактирования генома полиплоидных культур для создания в короткие сроки нетрансгенных растений с редактированными целевыми генами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-04019).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sovova T., Kerins G., Demnerova K., and Ovesna J. Genome editing with engineered nucleases in economically important animals and plants: state of the art in the research pipeline. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2016, 21, 41–62. doi: 10.21775/cimb.021.041
2. Waltz E. CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation. *Nat. Biotechnol.*, 2016, 34, 582. doi: 10.1038/nbt0616-582
3. Waltz E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*, 2016, 532 (7599), 293. 19754. doi: 10.1038/nature.2016.19754
4. Voytas D.F. and Gao C. Precision genome engineering and agriculture: Opportunities and regulatory challenges. *PLoS Biology*, 2014, 12(6), e1001877. doi: 10.1371/journal.pbio.1001877
5. Martin-Ortigosa S., Wang K. Proteolistics: a biolistic method for intracellular delivery of proteins. *Transgenic Res.*, 2014, 23(5), 743–756. doi: 10.1007/s11248-014-9807-y
6. Kanchiswamy C.N. DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement. *Plant Cell Rep.*, 2016, 35, 1469–1474. doi: 10.1007/s00299-016-1982-2
7. Svitashv S., Schwartz C., Lenderts B., et al. Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.*, 2016, 7, 13274. doi: 10.1038/ncomms13274
8. Liang Z., Chen K., Li T., et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.*, 2017, 8, 14261. doi 10.1038/ncomms14261
9. Andersson M., Turesson H., Olsson N., et al. Genome editing in potato via CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiol. Plantarum.*, 2018. doi: 10.1111/pp1.12731
10. Хромов А.В., Гушин В.А., Тимербаев В.И. и др. Конструирование гидовых РНК для редактирования генома картофеля с использованием системы CRISPR/CAS9. *Доклады Академии наук*, 2018, 479(3), 343–347.
11. Makhotenko A.V., Snigir E.A., Kalinina N.O., et al. Data on a delivery of biomolecules into *Nicotiana benthamiana* leaves using different nanoparticles. *Data Brief.*, 2018, 16, 1034–1037. doi 10.1016/j.dib.2017.12.031

12. Koike-Yusa H., Li Y., Tan E.-P., et al. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat. Biotechnol.*, 2014, 32, 267–273. doi: 0.1038/nbt.2800
13. van Overbeek M., Capurso D., Thompson M., et al. DNA repair profiling reveals nonrandom outcomes at Cas9-mediated breaks. *Mol. Cell.* 2016, 63, 633–646. doi: 10.1016/j.molcel.2016.06.037
14. Tan E.P., Li Y., Velasco-Herrera M.D.C., Yusa K., et al. Off-target assessment of CRISPR-Cas9 guiding RNAs in human iPS and mouse ES cells. *Genesis*, 2015, 53, 225–236. doi: 10.1002/dvg.22835
15. Ghezraoui H., Piganeau M., Renouf B., et al. Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. *Mol. Cell*, 2014, 55, 829–842. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.002
16. Hendel A., Bak R.O., Clark T.J., Kennedy A.B., et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat. Biotechnol.*, 2015, 33, 985–989. doi: 10.1038/nbt.3290
17. Shin H.Y., Wang Ch., Lee H.K., et al. CRISPR/Cas9 targeting events cause complex deletions and insertions at 17 sites in the mouse genome. *Nat. Commun.*, 2017, 8, 15464. doi: 10.1038/ncomms15464
18. Kosicki M., Tomberg K., and Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.*, 2018. doi: 10.1038/nbt.4192
19. Andersson M., Turesson H., Nicolia A., et al. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep.*, 2017, 36, 117–128. doi: 10.1007/s00299-016-2062-3
20. Danielsen S., Vårum K.M., Stokke B.T. Structural Analysis of Chitosan Mediated DNA Condensation by AFM: Influence of Chitosan Molecular Parameters. *Biomacromolecules*, 2004, 5(3), 928–936. doi: 10.1021/bm034502
21. Il'ina A.V., Varlamov V.P. Chitosan-based polyelectrolyte complexes: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2005, 41(1), 5–11. doi: 10.1007/s10438-005-0002-z

## Delivery of CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complex to Apical Meristem Cells for DNA-free Editing of Potato *Solanum tuberosum* Genome

A.V. KHROMOV<sup>1,2</sup>, A.V. MAKHOTENKO<sup>1,2</sup>, E.V. SNIGIR<sup>1</sup>, S.S. MAKAROVA<sup>1,2</sup>, V.V. MAKAROV<sup>1,2</sup>, T.P. SUPRUNOVA<sup>1</sup>, D.N. MIROSHNICHENKO<sup>1,3</sup>, N.O. KALININA<sup>1,2</sup>, S.V. DOLGOV<sup>1,3</sup>, and M.E. TALIANSKY<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Doka-Gene Technology Ltd, Rogachevo, 141880, Moskovskaya Oblast, Russia

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, 119234, Moscow Russia

<sup>3</sup>Pushchino Branch, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moskovskaya Oblast, 142290, Pushchino, Russia

\*e-mail: kalinina@genebee.msu.ru

Received June 8, 2018

Revised October 9, 2018

Accepted November 15, 2018

**Abstract**—A new approach to the potato genome editing using the CRISPR/Cas9 technology based on the delivery of ribonucleoprotein complexes of a pre-assembled Cas9 endonuclease and short guide RNA into apical meristem cells of potato (*Solanum tuberosum* cv Chicago) and the following regeneration of plants with edited alleles have been described. As model, a gene encoding potato phytoene desaturase was selected. Two methods for the delivery of the editing complex into plant cells were used: bioballistics bombardment (biolistics) by functionalized gold microparticles and vacuum infiltration by functionalized chitosan microparticles. The genetic analysis confirmed the editing of two alleles of the target gene by the biolistics method and one allele by infiltration. These data are in good correlation with the decrease in the target gene expression in both regenerant plant lines and temporary bleaching of the edited plant lines. The suggested methods for the DNA-free delivery of the Cas9 protein and short guide RNA complex into the apical meristem cells allow the development of an effective technology for rapid editing of polyploid crop genomes to produce non-transgenic plants with edited target genes.

**Key words:** CRISPR/Cas9 technology, *Solanum tuberosum*, apical meristem, complex of endonuclease Cas9 and short guide RNA, bioballistic bombardment, vacuum infiltration, phytoene desaturase gene editing.

**Acknowledgements**—This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 16-16-04019)

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-6-51-58